

## 大麻遗传转化研究进展

王思凡<sup>1</sup>, 蔡晓雪<sup>2</sup>, 孟祥霄<sup>1</sup>, 万会花<sup>1</sup>, 曹雪<sup>1</sup>, 米要磊<sup>1</sup>, 徐艳琴<sup>2</sup>, 孙伟<sup>1\*</sup>, 陈伟强<sup>1\*</sup>

1. 中国中医科学院中药研究所 中药鉴定与安全性评估北京市重点实验室, 北京 100700

2. 江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330004

**摘要:** 自从乌拉圭、加拿大和美国部分州将中药“火麻仁”的基原植物大麻 *Cannabis sativa* 合法化以来, 工业大麻的市场价值逐年提高。高市值推动大麻基础研究迅猛发展, 其遗传转化研究也实现了质的突破。目前, 发根农杆菌介导的大麻毛状根转化、根癌农杆菌和纳米材料介导的大麻瞬时转化、病毒介导的基因沉默和大麻稳定转化均已实现, 但是稳定遗传转化效率仍然不高。而建立高效的大麻遗传转化体系, 不但可加速大麻分子生物学的研究, 还可用于大麻新品种的创制。综述大麻遗传转化的研究进展, 以期为深入开展大麻遗传转化提供参考。

**关键词:** 大麻; 遗传转化; 瞬时转化; 稳定转化; 基因沉默; 纳米材料

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)09-2882-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.09.032

## Research progress on genetic transformation of *Cannabis sativa*

WANG Si-fan<sup>1</sup>, CAI Xiao-xue<sup>2</sup>, MENG Xiang-xiao<sup>1</sup>, WAN Hui-hua<sup>1</sup>, CAO Xue<sup>1</sup>, MI Yao-lei<sup>1</sup>, XU Yan-qin<sup>2</sup>, SUN Wei<sup>1</sup>, CHEN Wei-qiang<sup>1</sup>

1. Beijing Key Laboratory of Identification and Safety Evaluation of Chinese Medicine, Institute of Chinese Materia Medica, Chinese Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

2. School of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

**Abstract:** The market value of *Cannabis sativa* that is the original plant of Chinese medicine Huomaren (*Cannabis Fructus*) has increased year by year since the legalization in Uruguay, Canada and United States. The increased market value pushes the advance of basic research and genetic transformation of *C. sativa*, and has achieved great breakthrough. So far, *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root transformation, *Agrobacterium tumefaciens* and nanomaterials mediated transient transformation, virus induced gene silencing and stable transformation has been achieved, however, stable transformation efficiency is still lower. Establishment of efficient genetic transformation technology or improving transformation efficiency not only accelerates *C. sativa* molecular biology research, but also could be applied to create new varieties. Research progress on genetic transformation of *C. sativa* was reviewed in this paper, in order to provide reference for further study on genetic transformation of *C. sativa*.

**Key words:** *Cannabis sativa* L.; genetic transformation; transient transformation; stable transformation; gene silencing; nanomaterial

大麻 *Cannabis sativa* L. 又称线麻、火麻, 是隶属于大麻科 (Cannabinaceae) 大麻属的一年生草本植物, 原产于中亚地区<sup>[1]</sup>。大麻的纤维可用于纺织或造纸, 种子可以榨油或制造油漆, 果实“火麻仁”可入药<sup>[2]</sup>。因此, 大麻具有极高的经济价值和药用价值。在药用方面, 大麻雌性花器官或腺毛中的大麻素在止痛、抗炎、缓解焦虑以及治疗癫痫等方面

疗效显著<sup>[3-4]</sup>。大麻素属于萜酚类化合物, 目前已经分离并鉴定出的大麻素有 100 多种, 其中含量较高的有四氢大麻酚、大麻二酚和大麻环萜酚等<sup>[5-6]</sup>。四氢大麻酚具有镇痛、抗惊厥、止吐等作用, 而更为人们熟知的是其强烈的成瘾性<sup>[7-8]</sup>。因此, 四氢大麻酚的应用以及四氢大麻酚质量分数大于 0.3% (干质量) 大麻的种植都受到法律法规的严格管控<sup>[9]</sup>。大

收稿日期: 2022-01-20

基金项目: 中国中医科学院优秀青年科技人才项目 (ZZ14-YQ-028)

作者简介: 王思凡, 研究实习员, 研究方向为中药生物技术。E-mail: sfwang@icmm.ac.cn

\*通信作者: 陈伟强, 助理研究员, 研究方向为中药生物技术和药用植物分子生物学。E-mail: wqchen@icmm.ac.cn

孙伟, 研究员, 研究方向为中药生物技术和药用植物功能研究。E-mail: wsun@icmm.ac.cn

麻二酚同样具有抗炎、治疗癫痫、抗焦虑及抑郁的作用<sup>[10-11]</sup>。但大麻二酚不具有精神活性，因此，以大麻二酚为主的大麻的种植以及商业化应用在国内外的管理都更为宽松<sup>[9,12]</sup>。目前，大麻二酚被广泛开发用于医药、保健品、化妆品等多个行业，2020年市场规模约为70亿美元，预计2028年将超过180亿美元<sup>[13]</sup>。大麻品种多数是雌雄异株、异花授粉。其性别以及外界环境因素均影响着大麻的多种性状及药用成分含量<sup>[14]</sup>，因此，解析大麻次生代谢物质的合成过程和调控机制，以及与大麻发育相关的调控网络对提高大麻重要活性物质的生产具有重要意义。另外，大麻的繁殖和选育需要大量的筛选工作，但目前常规杂交育种存在性状分离严重、雌雄株鉴别耗时长、效率低下等问题<sup>[15]</sup>。我国2018年种植大麻约18 600 hm<sup>2</sup>，但主要以工业大麻为主。而药用大麻的种质资源匮乏，主要依赖进口。由于进口药用大麻受到严格管控以及种质价格昂贵等多种问题，无法满足目前国内科研和生产需求<sup>[12]</sup>。因此，改善大麻的种质资源，选育高药用成分的品种，对于大麻的工厂化生产至关重要。而上述工作，均需依靠一套稳定且高效的遗传转化方法。

植物遗传转化作为一项现代生物技术，在品种改良、基因功能解析方面有着广泛的应用。通过DNA重组技术将目的基因导入到目的生物的基因组中，产生可预期的、定向的遗传改变。借助转基因的手段，可以有效地提高植物的多种农艺性状表现，并可对植物次生物质代谢的分子机制进行深入研究。大麻素作为植物的次生代谢产物，通过遗传转化技术改变其代谢途径，增加有效成分含量，是优化其种质资源的有效手段。另外，遗传转化也有助于解析大麻素生物合成的调控机制，可为异源生

物合成重要大麻素奠定分子基础。目前，植物细胞遗传转化方法包括生物学方法、物理方法和化学方法3大类。生物学方法包括农杆菌介导法<sup>[16]</sup>、病毒载体法<sup>[17]</sup>、沾花法和花粉管通道法<sup>[18]</sup>；物理方法包括基因枪法<sup>[19]</sup>、显微注射法<sup>[20]</sup>、电激法<sup>[21]</sup>和纳米材料法<sup>[22]</sup>；化学方法包括聚乙二醇介导法<sup>[23]</sup>和脂质体介导法<sup>[24]</sup>等。大麻仅有农杆菌法、病毒载体法、纳米材料法和聚乙二醇法的相关报道（图1），其中又以农杆菌法使用最为广泛。

根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 和发根农杆菌 *Agrobacterium rhizogenes* 是植物遗传转化使用最为广泛的农杆菌，其分别含有肿瘤诱导质粒和根诱导质粒<sup>[25]</sup>。2种质粒中均含有具有特异序列的转化-DNA（transfer-DNA, T-DNA）区。当农杆菌感染植物受伤的部位时，肿瘤诱导质粒或根诱导质粒 virulence（vir）区域的基因可以被植物分泌的酚类和糖类物质诱导表达，这些基因编码的蛋白质将 T-DNA 区域从肿瘤诱导质粒或发根诱导质粒上面切割下来，以单链 DNA 的形式输送到植物细胞中<sup>[26]</sup>。进入细胞后的 T-DNA 可以稳定整合到植物细胞基因组，实现稳定转化；或游离于细胞内，实现瞬时表达，随后被核酸酶降解。根据外源 DNA 能否稳定整合到植物基因组并遗传给后代这一特征，大麻遗传转化的结果分为瞬时转化和稳定转化2类。因此，本文以转化结果为切入点，对目前大麻的不同转化方法进行介绍，以期为深入研究大麻的遗传转化提供可参考的依据。

### 1 瞬时转化

目前，大麻瞬时转化方法相对成熟，不论是农杆菌真空渗透侵染法<sup>[27-28]</sup>、纳米材料介导的瞬时转化<sup>[29]</sup>或病毒介导的基因沉默研究<sup>[30]</sup>均已在不同大



图1 大麻遗传转化重要事件时间轴

Fig. 1 Timeline of important events in *C. sativa* transformation

麻品种中实现。而农杆菌真空渗透法较其他方法而言具有成本低、操作简便、实施门槛低等特点,具有更普遍的适用性。

### 1.1 农杆菌真空渗透侵染法

真空渗透法利用大气负压将植物细胞间隙内的空气排除,在真空释放阶段,农杆菌进入细胞间隙,侵染植物细胞。Sorokin 等<sup>[27]</sup>利用根癌农杆菌 EHA105 对 4 种大麻 *Candida* CD-1、*Nightingale*、*Green Crack* CBD 和 *Holy Grail* 与 CD-1 的杂交种进行侵染。将含有  $\beta$ -葡萄糖苷酸酶基因 ( $\beta$ -glucuronidase, *gus*) 基因的农杆菌悬浮于 MS 液体培养基中至 600 nm 处的吸光度值为 0.6, 并加入 100  $\mu$ mol/L 乙酰丁香酮, 600 mm Hg (1 mm Hg=133 Pa) 抽吸 10 min 后转入 MS 培养基培养。随后利用 *gus* 染色在超过 50% (*gus* 染色阳性/转化样品总数) 的样品中检测到 *gus* 基因的瞬时表达。4 种品种中, *Nightingale* 转化效率最高, 达 70%。Deguchi 等<sup>[28]</sup>测试了不同处理方法对瞬时转化效率的影响, 在农杆菌重悬液 MS 中额外加入了 10 mmol/L 2-(*N*-吗啉代)乙磺酸和 2% 葡萄糖。8 kPa 抽吸 5~15 min 后, 进一步进行 22.5 kHz 的超声处理。在 8 种大麻, 包括雌雄同株的工业大麻 *Fedora* 17、*Felina* 32、*Ferimon*、*Futura* 75、*Santhica* 27 和 *USO* 31, 雌雄异株的工业大麻 *CRS-1* 和 *CFX-2* 的根、茎、叶、花和腺毛中均实现了 *gus* 或绿色荧光蛋白 (*green fluorescent protein*, *gfp*) 基因的瞬时表达。研究发现, 0.015% *Silwett-L-77*、5 mmol/L 维生素 C 和 0.05% *Pluronic F-68* 可显著提高瞬时转化效率。另外, 农杆菌 *GV3101* 相较于 *EHA105* 和 *LBA4404* 也具有更高的瞬时转化效率。除此之外, 不同品种的大麻瞬时转化效率也不尽相同。其中, *CRS-1* 转化效率最高, *Felina* 32 效率最低。除此之外, 还构建了八氢番茄红素脱氢酶 (*phytoene desaturase*, *PDS*) 基因的 RNA 干涉载体, 并利用真空法瞬时表达 RNA 干涉载体, 成功降低了 *PDS* 基因的表达量。尽管其在大麻当中的干涉效率不高, 但依然为研究大麻次生代谢产物在花中的合成途径及相关转录因子作用方式提供了新的验证方法。

### 1.2 其他

除了利用农杆菌外进行植物瞬时转化外, 基因枪法、聚乙二醇法、纳米材料法和病毒载体等也可实施瞬时遗传转化。目前, 针对药用植物大麻, 纳米材料法和病毒载体法已有报道。如 *Schachtsiek* 等<sup>[29]</sup>

使用棉花皱叶病毒对大麻 *Finola* 的后代进行了病毒诱导的基因沉默研究。棉花皱叶病毒基因组含有 2 个单链 DNA (DNA-A 和 DNA-B)<sup>[30]</sup>。DNA-A 编码基因组复制相关蛋白 AL1、抗沉默蛋白 AL2、复制相关蛋白 AL3、沉默抑制子 AL4 和外壳蛋白 AR1。DNA-B 编码迁移蛋白 BL1 和 BR1。目的基因片段插入到 DNA-A 的 *ARI* 基因中后, 将含有目的片段的 DNA-A 和 DNA-B 通过基因枪或农杆菌介导的方式导入植物细胞, 可引起植物系统性感染, 进一步引起 RNA 诱导的基因沉默<sup>[31]</sup>。该方法成功沉默了大麻的 *PDS* 基因。但沉默效率偏低, 仅在 20% 左右。

Ahmed 等<sup>[32]</sup>首次报道了运用纳米材料进行大麻遗传转化的实验。报道选用了二氧化硅包被的金纳米粒子作为载体, 将聚乙烯亚胺与含有羧基的、二氧化硅包被的纳米粒子共价结合。聚乙烯亚胺带有正电荷, 带有负电荷的 DNA 可以通过静电吸附作用与纳米材料结合。将结合有 DNA 的纳米材料注射到 1 个月龄大麻叶的背面, 5 d 后观测到报告基因 *gfp* 的表达, 实现外源基因的瞬时表达。

虽然目前大麻瞬时转化已可实现, 但是总体转化效率仍然偏低。如在 Sorokin 等<sup>[27]</sup>的报道中, *gus* 阳性大麻幼苗中仅少数细胞可实现 *gus* 染色, 与模式植物烟草比较, 转化效率仍然十分低。虽然 Deguchi 等<sup>[28]</sup>通过添加表面活性剂、抗氧化剂和增加细胞机械损伤等方法进一步提高了瞬时转化效率, 但是, 在特殊组织细胞例如雌性花器官和成熟叶片的转化效率仍然很低。全病毒载体虽然可以对植物造成系统性侵染, 具有相对较高的瞬时表达效率, 并有机会将目的性状传递到后代<sup>[33]</sup>。但是, 全病毒载体所能承载外源 DNA 大小有限, 很难用于长片段 DNA 的转基因实验研究。除此之外, 全病毒载体也易造成生物安全隐患, 很难通过环境释放进行大面积应用<sup>[34]</sup>。而纳米材料由于其特殊性和相对较高的造价, 并不适合常规实验室使用。

除了选择对农杆菌菌种和大麻基因型进一步的筛选, 以及抗氧化剂基、表面活性剂和机械损伤的应用之外, 合理使用基因沉默抑制子也有望进一步提高瞬时转化效率。基因沉默抑制子是一类来源于病毒的、具有抑制转录后基因沉默功能的特殊蛋白。瞬时转化产生的 RNA 会引起植物细胞适应性防御反应, 从而被植物细胞识别并通过 RNA 诱导的沉默复合体降解<sup>[35]</sup>。沉默抑制子可通过结合 siRNA 或

沉默复合物中的蛋白来阻止植物细胞对外源 RNA 的降解<sup>[36]</sup>, 从而提高外源基因的表达水平。来源于番茄丛矮病毒的 *P19* 基因是目前使用较为广泛的沉默抑制子<sup>[37]</sup>, 其在烟草瞬时转化中可显著提高瞬时转化效率<sup>[38]</sup>。因此, 在大麻瞬时转化载体中引入沉默抑制子有望进一步提高瞬时转化效率。

虽然目前大麻瞬时转化效率不高, 但是, 瞬时转化仍可以帮助研究人员在大麻细胞内进行大麻基因功能研究、蛋白质亚细胞定位、蛋白互作或在大麻细胞内瞬时生物合成大麻次生代谢物质。在本物种细胞内进行上述实验, 得到的实验结果相较于异源生物体具有更高的可信度。另外, 利用瞬时转化方法进行可遗传的基因组编辑已经在植物中实现<sup>[39]</sup>, 因此, 利用瞬时转化方法获得稳定编辑的大麻新种质资源也是未来大麻遗传转化的发展方向之一。

## 2 稳定转化

稳定转化的外源基因会整合到植物基因组, 并随目标植物基因组复制, 进而将转基因性状遗传到后代。目前植物最常用的稳定转化方法有发根农杆菌转化, 根癌农杆菌转化和基因枪转化。虽然以上 3 种方法均可获得稳定转化, 但发根农杆菌只能获得毛状根组织, 毛状根可以进行离体培养和扩繁, 但不能进一步分化生成完整植株。而根癌农杆菌和基因枪转化的愈伤组织或外植体通过分化、出芽、生根等组织培养过程, 有机会再生为完整转基因植株, 从而可通过有性繁殖将转基因性状传递到后代。但是, 不同物种或基因型的愈伤组织或外植体的再生条件和能力完全不同。目前, 大麻发根农杆菌转化和根癌农杆菌转化均已实现。

### 2.1 发根农杆菌转化

Wahby 等<sup>[40]</sup>测试了 9 种发根农杆菌和 3 种根癌农杆菌对 5 个大麻品种的侵染效率, 是迄今为止唯一一篇关于大麻发根农杆菌转化的报道。5 个大麻品种包括用于生产纤维的雌雄异株品种 Futura 77、Delta-llsosa、Delta 450 和种植于摩洛哥北部的雌雄同株药用大麻品种 CAN0111 和 CAN0221。研究人员对 5 d 龄幼苗的下胚轴、子叶节、子叶、初生叶和下胚轴、子叶、初生叶的外植体进行了侵染。研究还发现, 不论使用完整幼苗或是外植体, 下胚轴都是侵染效率最高的组织; 农杆菌前处理时, 诱导 *vir* 基因表达所使用的诱导剂浓度对侵染效率的影响不大, 仅使用 20  $\mu\text{mol/L}$  乙酰丁香酮即可达到理想的侵染效率; 所有发根农杆菌均可诱导幼苗产生

毛状根, 其中 R1606 的侵染效率最高, 达 98%; 发根农杆菌和不同品种大麻组合产生的毛状根均可进行离体培养; 根癌农杆菌侵染后 5~8 d 便可产生结瘤, 结瘤效率在不同菌种和大麻品种间无明显区别, 但结瘤的生长速度明显不同。同样, 结瘤也可用于体外离体培养。

目前, 常用的毛状根方法主要包括直接接种法、外植体接种法和原生质体接种法。直接接种法是将发根农杆菌直接涂抹或注射到外植体中, 使伤口处直接长出毛状根。外植体接种法是将外植体切成一定的大小, 用一定浓度的发根农杆菌侵染后进行共培养, 再经过筛选培养基进行培养, 最终获得毛状根。原生质体接种法与外植体接种法相似, 也需要对原生质体进行侵染, 共培养及筛选。同外植体接种法和原生质体接种法相比较而言, 直接接种法不需要对大麻进行原生质体或外植体培养, 一般 2~3 周便可获得毛状根组织。发根农杆菌在侵染植物后能够诱导其产生大量毛状根。诱导出的毛状根可以进行离体培养, 且生长速度快, 已逐渐应用到基因工程及品种改良等多个领域<sup>[41]</sup>。如大麻毛状根转化方法已经很成熟, 当前需要解决的难点是如何实现毛状根的大规模培养。另外, 毛状根转化虽然可以获得稳定整合的外源基因, 但是大麻素主要积累在雌性花器官中, 大麻根中并无证据表明可以积累大麻素类物质。因此, 在根中进行大麻素合成或调控基因的功能研究并不一定可行。获得完整转基因植株仍然是目前大麻遗传转化的重点研究领域之一。

### 2.2 根癌农杆菌转化

Mackinnon 等<sup>[42]</sup>首次报道了 2 种工业大麻 Fedora 19 和 Felina 34 的稳定转化, 以抗除草剂基因为筛选标记基因, 以多聚半乳糖醛酸酶抑制酶基因为目的基因, 运用农杆菌侵染根尖的方式成功获得了完整转基因大麻, 且转基因大麻表现出灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 抗性。该报道是首例大麻遗传转化实验报道, 虽然报道中并无详细的遗传转化操作过程, 但其借鉴了棉花<sup>[43]</sup>和矮牵牛花<sup>[44]</sup>的遗传转化方法。棉花、矮牵牛花与大麻都是双子叶植物, 报道中引用的棉花和矮牵牛花的遗传转化方法几近相同, 均使用了 LBA4404 农杆菌侵染茎尖外植体, 筛选标记基因选用 *nopaline synthase* (*nos*) 基因启动子驱动的新霉素磷酸转移酶基因 (*neomycin phosphotransferase II*, *nptII*)。

Feeney 等<sup>[45]</sup>报道了大麻的组织培养和原生质

体遗传转化实验,但未能获得再生的完整转基因植株。该报道选取了4个大麻品种。其中,Uniko-B和Kopolti是用于生产纤维的雌雄异株工业大麻,Anka和Felina 34是用于生产纤维和种子的雌雄同株大麻。大麻不同组织部位进行愈伤组织的诱导发现,5  $\mu\text{mol/L}$  2,4-二氯苯氧乙酸和1  $\mu\text{mol/L}$  激动素的MB培养基(含有大量和微量元素的MS培养基、B5 维他命、0.1 g/L 肌醇、3%蔗糖、8 g/L 琼脂粉、高温高压灭菌前 pH 5.8)可有效将Felina和Uniko的不同外植体诱导去分化为愈伤组织。但不同的外植体产生的愈伤组织具有不同的扩繁能力。其中,由茎、叶和叶柄产生的愈伤组织扩繁能力强,由子叶产生的愈伤组织扩繁能力弱。除来源于Uniko的愈伤组织外,其他3个品种的愈伤组织均可有效形成悬浮细胞系。在此基础上,使用EHA101农杆菌和磷酸甘露糖异构酶(Phosphomannose isomerase, *pmi*)筛选标记基因对Anka的悬浮细胞系进行了转化。*pmi*使用了拟南芥泛素启动子*Ubq3*,该基因在植物细胞中可将甘露糖转化为植物碳源。因此,含有*pmi*基因的细胞可以在仅含有甘露糖为碳源的培养基中存活,而不含有*pmi*的细胞由于不能将培养基中的甘露糖转化为碳源而死亡<sup>[46]</sup>。最终,利用愈伤组织基因组DNA聚合酶链式反应和Southern DNA印迹分析证明,其在大麻悬浮细胞中实现了稳定遗传转化。

大麻根癌农杆菌转化的突破是在2020年后,Zhang等<sup>[47]</sup>报道了大麻的遗传转化和基因组编辑的研究。这是首例含有详细遗传转化方法和基因组编辑方法的报道。首先测试了不同组织器官、基因型与发育相关的调控基因对再生效率的影响。以云麻7号为例,研究发现,开花15 d后采集的未成熟种子的胚性下胚轴的再生能力明显高于真叶、子叶和下胚轴等外植体,达到6.12%。不同基因型对再生的影响也十分明显。在100种测试的基因型中,约20种基因型的再生效率在4%以上。其中,云麻7号和Red Cherry Berry的杂交F2代DMG278具有最高的再生效率,达7.09%。进一步将不同的发育调控基因组合导入DMG278进行研究,过表达*CsGRF3-CsGIF1*、*CsWUS4*、*CsWUS4-CsSBH1*、*CsWUS4-CsIPT3*或*CsWUS4-CsSBH1-CsIPT3*的外植体生芽率比对照组高1.7倍。对DMG278的*PDS*基因实施了基因编辑,数据显示,从最初的3950个未成熟胚性下胚轴起始,最终获得4株基因编辑大

麻,另有83株的*PDS*基因编辑呈嵌合状态。与此同时,通过过表达*CsGRF3-CsGIF1*组合,利用农杆菌AGL1对未成熟胚性下胚轴进行侵染,获得1株转基因株系。

Galán-Ávila等<sup>[48]</sup>报道了一种更为高效的大麻遗传转化方法,选用了6种大麻品种,包括雌雄同株品种Ferimon、Felina 32、Fedora 17、Furura 75、USO31和雌雄异株品种Finola。大麻种子消毒后,在含有1.5%蔗糖的1/2 MS半固体培养基培养7 d,无菌状态下切取下胚轴或子叶,并对该外植体的再生和根癌农杆菌转化进行了研究。研究还发现无论是下胚轴或是子叶均可再生出新芽,但仅下胚轴再生的新芽可进一步生根;下胚轴和子叶再生芽率分别为53%、18%,其中,26%下胚轴再生芽可诱导生根;不同基因型的大麻下胚轴再生率也不尽相同,其中,Fedora 17最高,达76%,Finola最低,约为36%。

随后,研究人员选用农杆菌LBA4404和双元载体pBIN19对大麻外植体进行了遗传转化研究。载体pBIN19包括1个报告基因*gus*和赋予转基因细胞卡那霉素抗性的筛选标记基因*nptII*。研究发现,农杆菌与外植体共培养以及在含有100 mg/L卡那霉素的培养基中培养外植体都会显著降低外植体再生芽率和再生芽的生根率。其中下胚轴的再生率由平均53%下降为23%,子叶再生芽率由平均18%下降到1%。而再生芽的生根率也由平均26%下降到2.1%。最终,在120株下胚轴外植体再生苗中检测到6株转基因大麻,2株子叶外植体再生苗均为转基因植株。不同基因型的转化率差别明显,其中,Futura 75转化率最高,达28.6%<sup>[48]</sup>。

大麻的稳定转化虽然已经实现,但是相对转化效率仍然不高。物种的基因型、外植体的选择、外植体处理方式、培养基配方、农杆菌菌种、菌种侵染浓度、侵染时长和共培养条件等都会影响植物的遗传转化效率<sup>[49]</sup>。下胚轴是目前再生效率最高的外植体。Zhang等<sup>[47]</sup>和Galán-Ávila等<sup>[48]</sup>采用了不同的转化策略(图2)。Zhang等<sup>[47]</sup>运用农杆菌侵染大麻外植体后,外植体经过去分化形成愈伤、再生芽、生根3步产生转基因大麻。Galán-Ávila等<sup>[48]</sup>侵染外植体后,直接将外植体转移至生芽培养基,外植体不经过愈伤培养直接生芽。因此,获得转基因苗花费时间更少,转化效率更高,培养基配方也相对简单,外植体的获取也更为容易。另外,上述报道分别仅测试了农杆菌AGL1和LBA4404,未对其他农



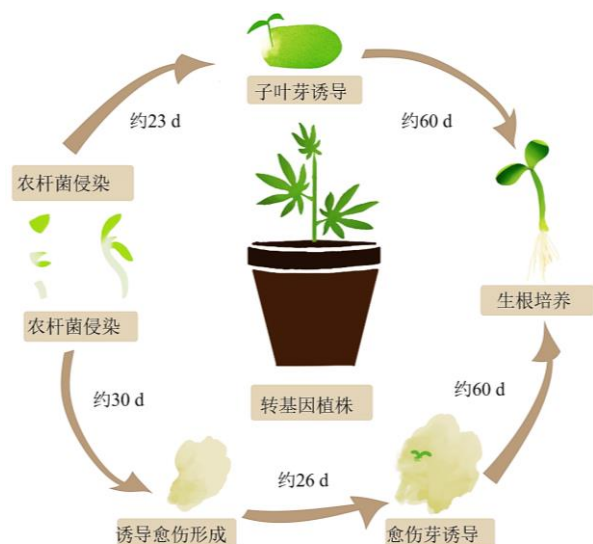


图2 大麻稳定转化简略图

Fig. 2 Schematic diagram of stable transformation of *C. sativa*

杆菌进行测试。而不同菌种对植物遗传转化效率具有显著影响<sup>[50]</sup>。通过进一步优化转化条件,相信在不久的将来,大麻稳定转化效率定可进一步提高。

### 3 结语与展望

大麻自古以来便被应用于疾病的治疗和纺织行业,但直到2000年才有了第一篇关于大麻遗传转化的报道<sup>[26]</sup>,比最早的植物遗传转化报道晚13年<sup>[6]</sup>。截至2021年,仅查询到10篇有关大麻遗传转化的研究报道,且主要集中在2019年之后。而这其中,仅有4篇报道获得了完整转基因植株<sup>[42,47-48,51]</sup>,且其中2篇未阐述详细的转化过程<sup>[42,51]</sup>,其余报道均是瞬时转化或毛状根转化的研究。

随着对大麻研究的不断深入,遗传转化的重要性逐渐凸显。但目前这些转化方法大多停留在对方法的探究。大量的转化方法或基因组编辑都停留在对特征基因如 *PDS*、*gfp* 等基因上,而对于功能基因的转化验证几乎没有。尽管多种遗传转化方法被证实是可行的,但是转化效率在不同载体及不同品种中存在巨大差异。在对特定品种进行遗传转化时,还需要进行大量的实验探究。笔者认为,未来大麻遗传转化研究主要包括以下几点:(1)提高转化效率,寻找适合于实验室培养和高通量转化的大麻品种。利用遗传转化培育植物新品种一般首先将目的基因导入较容易转化的实验室品种,然后对目的基因的结构、基因组位置、基因拷贝数、性状稳定性等进行评价,进而获得少数值得继续跟踪的转基因

株系。这一过程往往起始于成百上千的独立转化事件。因此,开发适合于高通量转化和实验室培养的大麻品种,是利用遗传转化技术培育大麻新品种的前提;(2)开发适合于大麻转化的重要性状基因。除了一般抗逆、抗病虫害等性状基因的开发,针对大麻不同用途开发相应的性转基因也是大麻遗传转化的主要内容。如开发可提高大麻纤维、大麻籽油或大麻素含量的重要性状基因。(3)利用转基因和基因组编辑技术,针对性的提高或降低大麻特定次生代谢产物,也是未来大麻遗传转化的研究方向之一。如利用 *CRISPR-Cas9* 基因编辑技术敲除四氢大麻酚合成酶,减少致瘾大麻素四氢大麻酚的生物合成等。

尽管大麻遗传转化体系的研究仍处于起步阶段,但伴随着大麻使用合法化进程的加快,会有越来越多的组织机构开始着手进行大麻遗传转化、基因编辑和新品种培育的研究,必将为未来大麻的生物学研究和大麻素的获取带来更多的技术手段和方法。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] 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.
- [2] Bonini S A, Premoli M, Tambaro S, et al. *Cannabis sativa*: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 227: 300-315.
- [3] Reddy D S, Golub V M. The pharmacological basis of *Cannabis* therapy for epilepsy [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2016, 357(1): 45-55.
- [4] Benbadis S R, Sanchez-Ramos J, Bozorg A, et al. Medical marijuana in neurology [J]. *Expert Rev Neurother*, 2014, 14(12): 1453-1465.
- [5] Gülck T, Möller B L. Phytocannabinoids: Origins and biosynthesis [J]. *Trends Plant Sci*, 2020, 25(10): 985-1004.
- [6] 刘志华, 王金兰, 赵明, 等. 工业大麻地上部分化学成分研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(15): 4463-4472.
- [7] Mulia A, Oktavia S, Ifora I. Pharmacological properties of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol: A review [J]. *EAS J Pharm Pharmacol*, 2021, 3(1): 13-20.
- [8] Bloomfield M A P, Ashok A H, Volkow N D, et al. The effects of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol on the dopamine system [J]. *Nature*, 2016, 539(7629): 369-377.
- [9] Mead A. Legal and regulatory issues governing *Cannabis* and *Cannabis*-derived products in the United States [J].

- Front Plant Sci*, 2019, 10: 697.
- [10] Noreen N, Muhammad F, Akhtar B, *et al.* Is cannabidiol a promising substance for new drug development? A review of its potential therapeutic applications [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2018, 28(1): 73-86.
- [11] Campos A C, Fogaça M V, Sonogo A B, *et al.* Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders [J]. *Pharmacol Res*, 2016, 112: 119-127.
- [12] 李秋实, 孟莹, 陈士林. 药用大麻种质资源分类与研究策略 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(20): 4309-4316.
- [13] Ugalmugle S, Swain R. Cannabidiol Market Statistics Global Forecasts – 2028 [EB/OL]. [2022-04-19]. <https://www.gminsights.com/industry-analysis/cannabidiol-cbd-market>.
- [14] 李俊, 朱雪雯, 万会花, 等. 大麻中大麻素类化学成分及其分析方法研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(24): 6414-6425.
- [15] Hennink S. Optimisation of breeding for agronomic traits in fibre hemp (*Cannabis sativa* L.) by study of parent-offspring relationships [J]. *Euphytica*, 1994, 78(1/2): 69-76.
- [16] Barton K A, Binns A N, Matzke A J, *et al.* Regeneration of intact tobacco plants containing full length copies of genetically engineered T-DNA, and transmission of T-DNA to R1 progeny [J]. *Cell*, 1983, 32(4): 1033-1043.
- [17] Ahlquist P, French R, Janda M, *et al.* Multicomponent RNA plant virus infection derived from cloned viral cDNA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81(22): 7066-7070.
- [18] Zhou G, Weng J, Zeng Y, *et al.* Introduction of exogenous DNA into cotton embryos [J]. *Methods Enzymol*, 1983, 101: 433-481.
- [19] Klein T M, Wolf E D, Wu R, *et al.* High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells [J]. *Nature*, 1987, 327: 70-73.
- [20] Neuhaus G, Spangenberg G, Mittelsten Scheid O, *et al.* Transgenic rapeseed plants obtained by the microinjection of DNA into microspore-derived embryoids [J]. *Theor Appl Genet*, 1987, 75(1): 30-36.
- [21] Fromm M E, Taylor L P, Walbot V. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation [J]. *Nature*, 1986, 319(6056): 791-793.
- [22] Torney F, Trewyn B G, Lin V S Y, *et al.* Mesoporous silica nanoparticles deliver DNA and chemicals into plants [J]. *Nat Nanotechnol*, 2007, 2(5): 295-300.
- [23] Krens F A, Molendijk L, Wullems G J, *et al.* *In vitro* transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA [J]. *Nature*, 1982, 296: 72-74.
- [24] Wordragen M, Shakya R, Verkerk R, *et al.* Liposome-mediated transfer of YAC DNA to tobacco cells [J]. *Plant Mol Biol Report*, 1997, 15(2): 170-178.
- [25] Chilton M D, Drummond M H, Merio D J, *et al.* Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: The molecular basis of crown gall tumorigenesis [J]. *Cell*, 1977, 11(2): 263-271.
- [26] Gelvin S B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: The biology behind the “gene-jockeying” tool [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, 67(1): 16-37.
- [27] Sorokin A, Yadav N S, Gaudet D, *et al.* Transient expression of the  $\beta$ -glucuronidase gene in *Cannabis sativa* varieties [J]. *Plant Signal Behav*, 2020, 15(8): 1780037.
- [28] Deguchi M, Bogush D, Weeden H, *et al.* Establishment and optimization of a hemp (*Cannabis sativa* L.) agroinfiltration system for gene expression and silencing studies [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 3504.
- [29] Schachtsiek J, Hussain T, Azzouhri K, *et al.* Virus-induced gene silencing (VIGS) in *Cannabis sativa* L [J]. *Plant Methods*, 2019, 15: 157.
- [30] Davies J W, Stanley J. Geminivirus genes and vectors [J]. *Trends Genet*, 1989, 5(3): 77-81.
- [31] Tuttle J R, Haigler C H, Robertson D. Method: low-cost delivery of the cotton leaf crumple virus-induced gene silencing system [J]. *Plant Methods*, 2012, 8(1): 27.
- [32] Ahmed S, Gao X F, Jahan M A, *et al.* Nanoparticle-based genetic transformation of *Cannabis sativa* [J]. *J Biotechnol*, 2021, 326: 48-51.
- [33] Gleba Y, Marillonnet S, Klimyuk V. Engineering viral expression vectors for plants: The ‘full virus’ and the ‘deconstructed virus’ strategies [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, 7(2): 182-188.
- [34] Canto T. Transient expression systems in plants: Potentialities and constraints [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 896: 287-301.
- [35] Brodersen P, Voinnet O. The diversity of RNA silencing pathways in plants [J]. *Trends Genet*, 2006, 22(5): 268-280.
- [36] Baumberger N, Tsai C H, Lie M, *et al.* The *Polevirus* silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation [J]. *Curr Biol*, 2007, 17(18): 1609-1614.
- [37] Lakatos L, Szittyá G, Silhavy D, *et al.* Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses [J]. *EMBO J*, 2004, 23(4): 876-884.
- [38] Sainsbury F, Thuenemann E C, Lomonossoff G P. pEAQ: Versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants [J]. *Plant Biotechnol J*, 2009, 7(7): 682-693.

- [39] Metje-Sprink J, Menz J, Modrzejewski D, *et al.* DNA-free genome editing: Past, present and future [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 9: 1957.
- [40] Wahby I, Caba J M, Ligerio F. *Agrobacterium* infection of hemp (*Cannabis sativa* L.): Establishment of hairy root cultures [J]. *J Plant Interact*, 2013, 8(4): 312-320.
- [41] Shi M, Liao P, Nile S H, *et al.* Biotechnological exploration of transformed root culture for value-added products [J]. *Trends Biotechnol*, 2021, 39(2): 137-149.
- [42] MacKinnon L, McDougall G, Aziz N. Progress towards transformation of fibre hemp [J]. *Genetics*, 2000, 2001: 84-86.
- [43] Zapata C, Park S H, El-Zik K M, *et al.* Transformation of a Texas cotton cultivar by using *Agrobacterium* and the shoot apex [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 98(2): 252-256.
- [44] Smith R H, Ulian E, Gould J H. Transformation of plants via the shoot apex [J]. *Methods Mol Biol*, 1990, 6: 335-340.
- [45] 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.
- [46] Gadaleta A, Giancaspro A, Blechl A, *et al.* Phosphomannose isomerase, pmi, as a selectable marker gene for durum wheat transformation [J]. *J Cereal Sci*, 2006, 43(1): 31-37.
- [47] 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.
- [48] Galán-Ávila A, Gramazio P, Ron M, *et al.* A novel and rapid method for *Agrobacterium*-mediated production of stably transformed *Cannabis sativa* L. plants [J]. *Ind Crops Prod*, 2021, 170: 113691.
- [49] Jin S X, Zhang X L, liang S G, *et al.* Factors affecting transformation efficiency of embryogenic callus of Upland cotton (*Gossypium hirsutum*) with *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2005, 81(2): 229-237.
- [50] Bakhsh A, Anayol E, Ozcan S. Comparison of transformation efficiency of five *Agrobacterium tumefaciens* strains in *Nicotiana tabacum* L. [J]. *Emir J Food Agric*, 2014, 26(3): 259.
- [51] 姜颖, 孙宇峰, 韩喜财, 等. 大麻 THCA 合成酶基因 (CsTHCA)RNA 干扰载体的构建及遗传转化 [J]. *植物遗传资源学报*, 2019, 20(1): 207-214.

[责任编辑 崔艳丽]