

# Informe final publicable de proyecto

## Un estudio sobre la genética, actividad y estructura de cannabinoides sintasas en Cannabis.

Código de proyecto ANII: FCE\_3\_2018\_1\_148016

09/09/2022

**AGORIO NORSTRÖM, Astrid** (Responsable Técnico - Científico)

**MALTA GATTO, Lucia** (Investigador)

**VIGANLE ALCARRAZ, Lucia** (Investigador)

**BERNÁ, Luisa** (Investigador)

**DANS PUIGGRÓS, Pablo Daniel** (Investigador)

**MILANO VIDAL, Andrés** (Investigador)

**NAYA MONTEVERDE, Hugo Mario** (Investigador)

**ROMERO BRUNETTO, Héctor Gabriel** (Investigador)

---

MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS "CLEMENTE ESTABLE"

(Institución Proponente) \\ UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS \\

INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO \\ FUNDACIÓN DE APOYO AL INSTITUTO CLEMENTE ESTABLE

## Resumen del proyecto

El hombre ha usado Cannabis desde hace más de ocho mil años, atraído por sus cualidades como fuente de fibras, aceites, granos, sustancias medicinales y sustancias psicoactivas. Esta larga historia de la planta junto al hombre y su continua selección, sumado al hecho de que es una especie principalmente dioica, polinizada por el viento (lo cual favorece la hibridación), con un ciclo de vida corto, han hecho que en la actualidad existan cientos de variedades de Cannabis, ya sea silvestres o seleccionadas según el uso que se le quiera dar.

Las plantas de Cannabis poseen un metabolismo secundario extremadamente rico en donde los cannabinoides tienen un papel protagónico. De los más de 120 cannabinoides descritos para Cannabis, el ácido delta-9-tetrahidrocannabinólico (THCA) y el ácido cannabidiólico (CBDA), junto con sus formas oxidadas (THC y CBD, respectivamente) son los más abundantes y estudiados, seguidos por el ácido cannabicrómico (CBCA) y el ácido cannabigerólico (CBGA), y sus formas oxidadas CBC y CBG. Todos estos cannabinoides son únicos de Cannabis, ya que no se han encontrado en ninguna otra especie.

Hace más de cincuenta años se sabe que el THC es responsable del efecto psicoactivo de Cannabis, pero debido a las prohibiciones ha sido muy poca la investigación en este tema. Ha sido recién a finales del siglo XX, con el descubrimiento del Sistema Endocannabinoide animal, que se ha producido un cambio en la concepción sobre la investigación en cannabinoides y su efecto en humanos. Como consecuencia de las investigaciones recientes, actualmente el THC se usa, por ejemplo, para aumentar el apetito en pacientes con SIDA o como antiemético en pacientes bajo quimioterapias. El CBD es muy conocido por su propiedad anticonvulsiva demostrada en ensayos clínicos. De hecho, en 2018, la FDA aprobó el uso de CBD para el tratamiento de convulsiones en pacientes epilépticos. Además, el CBD posee otras propiedades terapéuticas como ansiolítico, antidepresivo, antipsicótico, anti-náuseas, antioxidante, antiinflamatorio, anti-artritis y antineoplásico. Se ha visto que el efecto de Cannabis difiere del de THC puro en que la planta mitiga efectos secundarios del THC (como disforia, taquicardia, ansiedad y pánico) o mejora sus efectos en algunos casos. Otros cannabinoides y terpenos producidos por Cannabis jugarían un papel en esta marcada diferencia (a lo que se denomina "efecto séquito"). Los diferentes usos y efectos de los cannabinoides suscitan un gran interés por entender que factores determinan que Cannabis favorezca la síntesis de un cannabinoide frente a otro y el nivel de su producción. Hallazgos que permitan identificar los factores que determinan que Cannabis produzca un cannabinoide frente a otro, ayudarían a la selección de variedades de Cannabis con características adecuadas para uso terapéutico, así como a dirigir y acortar los procesos de selección de variedades a nivel agronómico e industrial. En este proyecto hemos generado herramientas moleculares e información que ayudarían en este sentido.

Al estudiar cómo Cannabis prioriza la síntesis de THCA frente a CBDA, hay que tener en cuenta que THCA, CBDA y CBCA son sintetizados por tres enzimas que utilizan un mismo sustrato, el CBGA. Estas enzimas son la THCA sintasa (THCAS), la CBDA sintasa (CBDAS) y la CBCA sintasa (CBCAS). Así, la producción de los cannabinoides mayoritarios, THCA y CBDA, está determinada por la actividad relativa de las enzimas THCAS y CBDAS en la planta, la actividad de la CBGA sintasa (CBGAS) que produce el sustrato para THCAS, CBDAS y CBCAS, así como la actividad de la CBCAS ya que ésta puede competir por el CBGA y disminuir su disponibilidad. Estudios previos muestran que Cannabis puede tener más de un gen que codifica para cada una de estas enzimas, habiendo mucha confusión sobre cuantos genes hay en el genoma y cómo se regulan estos genes.

Aquí nos propusimos estudiar el comportamiento de los genes que codifican para THCAS, CBDAS, CBCAS y CBGAS en diferentes variedades de Cannabis, con el fin de identificar factores genéticos que puedan influir sobre la síntesis de THC, CBD y CBC. Para este estudio, las muestras estudiadas fueron donadas por autocultivadores registrados en el IRCCA y comprenden variedades ricas en THC, ricas en CBD y THC: CBD balanceado.

Los genes que codifican para THCAS, CBDAS y CBCAS poseen un altísimo porcentaje de identidad (90-96%), son extremadamente parecidas a nivel de su secuencia de ADN, esto dificulta mucho su estudio a nivel molecular ya que son muy difíciles de distinguir las unas de las otras. Esto ha generado mucha confusión durante mucho tiempo sobre la identidad de los genes, su presencia en los genomas y su expresión. En este proyecto hemos logrado desarrollar un método que permite detectar de forma específica a los genes relacionados con THCAS, CBDAS, CBCAS y CBGAS en los genomas de Cannabis, distinguiendo unos de otros y permitiendo cuantificar el número de copias de estos genes en los

genomas de variedades de Cannabis. Este método nos ha permitido mostrar que todas las variedades estudiadas, independiente de si producen THC o CBD, poseen una copia del gen CBGAS. Mostramos que las variedades ricas en THC tienen un solo gen que codifica para THCAS (el equivalente a una copia en cada cromosoma) y este se expresa en altas cantidades en flores femeninas, mientras que no poseen el gen que codifica para CBDAS. Esto explica el fenotipo químico de las plantas (ricas en THC y sin CBD). De forma análoga, pudimos mostrar que las variedades ricas en CBD poseen el equivalente a una copia en cada cromosoma del gen que codifica para CBDAS, que se expresa en altas cantidades en flores femeninas, y que no poseen el gen que codifica para la THCAS. La variedad THC:CBD balanceada estudiada muestra tener el equivalente a un gen que codifica para THCAS en un cromosoma y un gen que codifica para CBDAS en el otro cromosoma, expresándose ambos de forma similar en flores femeninas. Esto explica el fenotipo químico descrito en donde la planta produce cantidades equivalentes de THC y CBD. Con el mismo método pudimos determinar que las diferentes variedades poseen un amplio número de copias de genes CBCAS y otros genes similares a CBDAS (CBDAS-like, que sumamos al estudio y que no se sabe aún que cannabinoides producen), independientemente de que posean THCAS o CBDAS. Hemos detectado hasta 9 copias de CBCAS o CBAS-like en un genoma haploide (el promedio de copias que habría en un solo cromosoma, de los dos del par). Al contrario de THCAS y CBDAS, se vio que tanto CBCAS como CBDAS-like se expresan muy poco en flores. Al considerar el análisis del conjunto de todas las cannabinoides sintetasas en diferentes variedades de Cannabis, hemos visto que existe una gran variación en el número de copias de estos genes en las diferentes variedades, habiendo detectado entre 4 y 16 copias de estos genes por genoma haploide (promedio por cromosoma, de los dos del par). Todos estos hallazgos indican que hay cannabinoides sintetasas en los genomas que no se sabe que producen y podrían ser responsables de diferencias en el perfil de cannabinoides minoritarios en las diferentes variedades de Cannabis. Estos cannabinoides podrían ser responsables del "efecto séquito", y por tanto de interés a la hora de estudiar el uso de las diferentes variedades.

Utilizando el mismo método desarrollado en este proyecto, se analizó una población de plantas hermanas, derivadas de un cruce entre una planta rica en THC (Skunk) y una planta THC:CBD balanceada (CBD-crack), para estudiar en más detalle la distribución en los cromosomas y la herencia de los genes que codifican a las cannabinoides sintetasas (además de verificar la precisión del método desarrollado). El estudio mostró muy buena precisión al estudiar el número de copias de los genes estudiados en las plantas hermanas. A nivel de los parentales, mostró que los genes segregan de forma Mendeliana. Además, permitió inferir que Skunk posee una THCAS en cada uno de sus cromosomas y que CBD-crack posee un gen THCAS en un cromosoma y un gen CBDAS en el otro. Además, mostró que ambos parentales poseen uno de sus cromosomas sin genes CBCAS, por lo que las CBCAS segregan en la población de hijas, habiendo hijas sin genes CBCAS e hijas con el doble de genes de CBCAS que los parentales. Este hallazgo puede ser de interés para estudiar el papel de las CBCAS o CBDAS-like en la producción de cannabinoides menores. También es interesante al pensar en planes de mejora genética en donde CBCAS puede ser de interés conservar o eliminar, dada su capacidad de producir CBC. Sin duda, dada la gran variación en el número de cannabinoides sintetasas que hemos demostrado existe en las diferentes variedades de Cannabis, y entre cromosomas, el método desarrollado es útil para la caracterización de variedades y para asistir planes de mejora genética enfocados en la producción de cannabinoides.

**Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Genética molecular vegetal**

**Palabras clave: THCA sintasa / CBDA sintasa / Cannabis /**

### **Introducción**

El hombre ha usado Cannabis hace más de ocho mil años, atraído por sus cualidades como fuente de fibras, aceites, granos, sustancias medicinales y sustancias psicoactivas (Kovalchuck\_2020). Esta larga historia de la planta junto al hombre y su continua selección, sumado al hecho de que es una especie principalmente dioica, polinizada por el viento (favoreciendo la hibridación), con un ciclo de vida corto, han hecho que en la actualidad existan cientos de variedades de Cannabis seleccionadas según el uso que se le quiera dar. Hasta hace muy poco se hablaba de tres especies dentro del género Cannabis (Hilling\_2004, Hilling\_2005), actualmente gran parte de la comunidad científica habla de una sola especie (C. sativa L.) (Kovalchuck\_2020; Welling\_2016, Vergara\_2017; Henry\_2015). El debate sobre el número de especies se ha centrado principalmente en la gran variedad de fenotipos químicos que existen en Cannabis, sugiriendo una gran variabilidad genética.

Las plantas de Cannabis poseen un metabolismo secundario extremadamente rico en donde los cannabinoides tienen un papel protagónico. Estos últimos son compuestos terpenofenólicos producidos en los tricomas glandulares de la planta. De los más de 120 cannabinoides descritos para Cannabis, el ácido delta-9-tetrahidrocannabinólico (THCA) y el ácido cannabidiólico (CBDA), junto con sus formas descarboxiladas (THC y CBD, respectivamente) son los más abundantes y estudiados (Hanus\_2009; Mechoulam\_2014; Kinghorn\_2017), recientemente ha crecido el estudio e interés por otros dos cannabinoides presentes en menor proporción, que son el ácido cannabícromico (CBCA) y ácido cannabigerólico (CBGA), y sus formas oxidadas CBC y CBG (Maione\_2011; Izzo\_2012; Shinjo & Di Marzo\_2013).

Hace más de cincuenta años se sabe que el THC es responsable del efecto psicoactivo de la marihuana (Gaoni & Mechoulam\_1964). Pero ha sido recién con el descubrimiento de los receptores de cannabinoides y endocannabinoides en mamíferos (Devane\_1988; Devane\_1992; Hanus\_2009) que se ha producido un cambio en la concepción sobre la investigación en cannabinoides con fines terapéuticos. Como consecuencia, actualmente el THC se usa, por ejemplo, para aumentar el apetito en pacientes con SIDA o como antiemético en pacientes bajo quimioterapias (Mücke\_2018; Abuhasira\_2018; McPartland\_2015; Bostwick\_2012). El CBD es muy conocido por su propiedad anticonvulsiva demostrada en ensayos clínicos (Maa & Figi\_2014; Perucca\_2017). De hecho, en 2018, la FDA aprobó el uso de CBD para el tratamiento de convulsiones en pacientes epilépticos (<https://www.fda.gov/news-events/comunicados-de-prensa/la-fda-aprueba-el-primer-medicamento-compuesto-por-un-ingrediente-activo-derivado-de-la-marihuana>). Además, el CBD posee otras propiedades terapéuticas como ansiolítico, antidepresivo, antipsicótico, anti-náuseas, antioxidante, antiinflamatorio, antiartritis y antineoplásico (McPartland\_2015). Se ha visto que el efecto de Cannabis difiere del de THC puro en que la planta mitiga efectos secundarios del THC (como disforia, taquicardia, ansiedad y pánico) o mejora sus efectos en algunos casos. Otros cannabinoides y terpenos producidos por Cannabis jugarían un papel en esta marcada diferencia (a lo que se le denomina "efecto séquito") (Russo\_2011; Russo\_2017; McPartland\_2015; Russo\_2006). Los diferentes usos y efectos de THC y CBD suscitan un gran interés por entender que factores determinan que Cannabis favorezca la síntesis de un cannabinoide frente a otro y el nivel de su producción. Por ejemplo, actualmente existe un especial interés por plantas ricas en CBD para uso terapéutico. Hallazgos que permitan identificar a estos factores ayudarían a la selección de variedades de Cannabis con características adecuadas para uso terapéutico, así como a dirigir y acortar los procesos de selección de variedades a nivel agronómico e industrial.

Para entender cómo Cannabis regula la síntesis de THCA y CBDA, hay que tener en cuenta que la síntesis de éstos está íntimamente relacionada por tener un precursor común, el CBGA, sintetizado por la CBGA sintasa o (CBGAS), que según la actividad de las enzimas THCA sintasa (THCAS) y la CBDA sintasa (CBDAS) se convierte en THCA o CBDA (Sirikantaramas\_2004; Taura\_2007). El CBCA también se sintetiza a partir del CBGA por actividad de la CBCA sintasa (CBCAS) (Lavery\_2019), por lo que compite por el CBGAS. Así, la relación THCA:CBDA está determinada por la actividad relativa de THCAS y CBDAS, que dependerá de la cantidad y eficiencia de estas enzimas presentes en la planta. Es importante resaltar que la cantidad de THCA y CBDA en la planta varía con el tejido, el sexo, y las condiciones ambientales, lo que suma factores a tener en cuenta al estudiar la regulación de la síntesis de cannabinoides. La inflorescencia femenina es el tejido con mayor contenido de estas moléculas, pudiendo contener un 30% de su peso seco (Bostwick\_2012). De ahí el gran interés por las inflorescencias para el uso terapéutico o adulto, y para investigar la biosíntesis de cannabinoides.

Los loci de los genes que codifican THCAS y CBDAS están muy relacionados entre sí. Estudios de segregación genética muestran que éstos están en un mismo grupo de ligamiento (De Meijer\_2003; De Meijer\_2009) del cromosoma 7 de Cannabis (Grassa\_2021; Wenger\_2020; Van Velzen\_2021). Tan cerca están, que se creyó por mucho tiempo que eran alelos de un sólo locus. El hecho de que los genes THCAS y CBDAS posean una alta identidad a nivel de su secuencia codificante, 89,8% (Hurgobin\_2021), también alentó esta hipótesis. Hasta que en el año 2015 los trabajos de Weiblen y col. y Onorfi y col. indicaron que existía al menos un locus para THCAS y otro para CBDAS, pero también había indicios de que podía haber varios loci. Surgió el desconcierto sobre el número de loci de THCAS y CBDAS, alimentado por el altísimo porcentaje de identidad (96%) entre los genes que codifican para la CBCAS y la THCAS (Hurgobin\_2021), ya que en ese entonces se consideraba que los genes que hoy sabemos codifican para las CBCAS eran variantes de THCAS (hasta que en 2019 se demostró la existencia de un gen que codifica para la CBCAS (Lavery\_2019)). En este contexto, y en aquel momento, se alimentó la idea sobre la existencia de variación en el número de copias de THCAS en las diferentes variedades de Cannabis (Onorfi\_2015; McKernan\_2015). Sumado a esto, se detectaron variantes incompletas o no funcionales de éstos genes (Kojoma\_2006; Weiblen\_2015; Onofri\_2015; McKernan\_2015). Por otro lado, además de considerarse esta variación, se detectaba mucha variabilidad en los niveles de expresión de los considerados genes THCAS y CBDAS (Onorfi\_2015) y de

las variantes incompletas o no funcionales de éstos genes (Kojoma\_2006; Taura\_2007; Cascini\_2012; Weiblen\_2015; Onofri\_2015), incluidos niveles de expresión de THCAS o CBDAS muy altos que no correlacionaban con los niveles de cannabinoides en la planta (Onofri\_2015; Cascini\_2012) y secuencias completas en el genoma que no se transcribían (Kojoma\_2006). Todo esto generó un gran desconcierto sobre cómo se organizan y regulan los loci de THCAS y CBDAS. En este contexto se concibió este proyecto, en el año 2018, y surgían preguntas como: ¿Cuántas copias de estos genes existen en las diferentes variedades? ¿Cuántas se transcriben? ¿Cómo son sus promotores? ¿Cómo incide una copia sobre la otra? ¿Qué factores actúan sobre la regulación de la transcripción de las diferentes copias? En el proyecto presentado se buscó contribuir a responder algunas de estas preguntas.

Las múltiples copias de THCAS y CBDAS en algunas variedades inducían a pensar que éstas impactarían sobre los niveles de transcrito. En algunas especies vegetales se ha visto como múltiples copias de una secuencia provocan un alto nivel de transcrito con con, y HMA4 en *Arabidopsis hallari* que confiere tolerancia al zinc (Hanikenne\_2007). Existen estudios que muestran diferencias en los niveles de transcritos de THCAS y CBDAS de varios órdenes de magnitud entre variedades de *Cannabis* (Cascini\_2012; Onofri\_2015). Se postuló la posibilidad de que en *Cannabis* pudiera actuar un mecanismo de regulación dependiente del número de copias, con un aumento de la transcripción como en el caso de Bot1, MATE1 y HMA4, o una disminución de la transcripción debido a promotores menos activos por sus secuencias reguladoras. No sólo la secuencia nucleotídica sino también el estado epigenético de un loci puede jugar un papel importante en la regulación de la transcripción del gen. Estudios en plantas demuestran como la existencia de duplicaciones de secuencias, parálogos no funcionales o secuencias truncadas de alta identidad con un gen dado, inciden sobre la transcripción del gen funcional provocando una modificación en el estado epigenético del mismo. Esto implica la aparición de epialelos dependientes de la metilación de citosinas, una marca que influye sobre la forma en que los genes son transcritos. Existen ejemplos, como la variante hipermetilada del gen *Cnr* de tomate que produce silenciamiento y genera alteraciones en la maduración del fruto (Maning\_2006), la metilación del gen *CmWIP1* de melón, que provoca alteraciones en la determinación del sexo (Martin\_2009) y otros epialelos identificados en arroz (Miura\_2009). El hallazgo de epialelos en *Arabidopsis* permitió identificar alguno de los mecanismos moleculares subyacentes a la generación y mantenimiento de epialelos, mostrando como duplicaciones génicas en la cual un loci que codifica para una enzima funcional está silenciado por metilación y el otro se transcribe, y en donde participa la vía RNA dependent DNA Methylation (RdDM) (Durand\_2012; Agorio\_2017). Se postuló que los loci de THCAS y CBDAS podían estar bajo un control con estas características en algunas variedades de *Cannabis* dado los reportes de múltiples loci, expresión de ARN aberrantes y existencia de copias funcionales que no se expresan (Kojoma\_2006; Taura\_2007; Cascini\_2012; Weiblen\_2015; Onofri\_2015; McKerman\_2015). Si bien la complejidad de los loci para THCAS y CBDAS y su regulación son sumamente interesantes desde un punto de vista biológico y existe un gran interés a nivel médico e industrial por poder predecir el fenotipo químico (quimiotipo) de una planta, aún falta información sobre cómo funcionan estos genes.

En este proyecto se abordó el estudio del número de copias y variantes de los genes CBDAS y THCAS (posteriormente se incluyó CBCAS-like y genes CBDAS-like) en variedades de *Cannabis* donadas por autocultivadores registrados, así como el estudio de la expresión de estos genes y pseudogenes, y el estudio de factores epigenéticos que podrían afectar la expresión de los genes estudiados. Se planteó identificar los genes CBDAS y THCAS (posteriormente también CBCAS-like y CBDAS-like) y sus variantes en las variedades estudiadas mediante clonado y secuenciación Sanger. Por otro lado, se planteó analizar los niveles de expresión de los genes que se identificaran mediante RT-qPCR. De esta forma se establecería que variantes se expresan y cuáles no, para sobre ellas estudiar factores epigenéticos que pudieran justificar las diferencias encontradas. Para esto último se planteó estudiar el estado de metilación de los genes mediante el estudio de 5 metil-citosina (5mC) en promotores y cuerpos de los genes, utilizando la técnica dependiente de la enzima MspI y la secuenciación con bisulfito de sodio. Estos ensayos permitirían determinar si existía metilación en estos genes y determinar en qué posición se encontraba, lo cual ayudaría a inferir sobre el mecanismo molecular subyacente a la metilación (RdDM, u otro).

Por otro lado, en este proyecto, se planteó tomar una variedad de *Cannabis* como referencia para realizar un estudio sobre su genoma e identificar los loci y pseudogenes de THCAS y CBDAS (posteriormente se agregó el estudio de CBCAS-like y CBDAS-like) para conocer su organización y entender su funcionamiento. Para ello se planteó secuenciar fragmentos largos de ADN por NGS de tercera generación, 10.000-100.000pb, utilizando Pacbio, que permitirían obtener la información sobre los loci y su organización. Además de obtener la respuesta sobre la cantidad, estructura y organización de los loci, los datos permitirán ensamblar el genoma de una variedad nueva de *Cannabis* y permitir el trabajo de tesis de un estudiante de postgrado.

## Metodología/diseño del estudio

Para trabajar en este proyecto se contó con muestras de Cannabis donadas por autocultivadores registrados en el IRCCA. El conjunto de muestras consistió en hojas y flores de 23 variedades. Según las declaraciones de los proveedores, había diez variedades ricas en THC o quimiotipo 1 (24K, Amnesia Gold, Chemdog, Chocolope, Galaxy, Guanabana, Lemon OG Haze, Moby Dick, NL5-Haze Mist, Skunk), una variedad con THC:CBD balanceado o quimiotipo 2 (CBD-crack), ocho variedades ricas en CBD o quimiotipo 3 (Hot Blonde, Moca, Interra, Cherry Ch, BaOx, Fedtonic, Queen Dream, Ultraviolet), una variedad de uso para fibra o cáñamo (Luma), y tres variedades con ancestros provenientes de la India de los cuales no se sabe su contenido de THC o CBD (denominadas aquí Inida 1, India 2 y India 3). En el conjunto había muestras de plantas hembra para 20 variedades y muestras de plantas macho para 3 variedades (Skunk, Luma e India 1). También se contó con una población de 34 plantas hermanas (machos y hembras), progenie derivada de un cruce entre un macho rico en THC (Skunk) y una hembra con THC:CBD balanceado (CBD-crack). Disponer de todo este material permitió estudiar una gran diversidad de genotipos, y profundizarse en el estudio de las cannabinoides sintasas a nivel de genoma y cromosoma en variedades con diferentes procedencias.

En una primera instancia se planteó analizar a las THCAS y CBDAS presentes en los genomas de las diferentes variedades estudiadas mediante amplificación por PCR, clonado y secuenciación por Sanger, partiendo de ADN genómico. Esto permitía identificar las variantes genéticas de los genes estudiados existentes y el número de copias de los mismos en diferentes variedades. Para esto se diseñaron cebadores, realizaron PCR con la enzima Phusion High-Fidelity DNApol (Thermo Fisher), se clonó los productos de PCR utilizando el kit CloneJET PCR Cloning Kit (thermo Fisher), se realizaron minipreps con el kit ZymoPURE Plasmid MniPrep Kit (Zymoresearch), se secuenció en Macrogen (Corea) y se analizaron las secuencias con el programa CLCworkbench (Qiagen). Se procedió en este sentido con éxito, y se obtuvo un conjunto de datos. Tras obtener estos primeros resultados y analizarlos se vio que la variabilidad era más grande de lo esperado y que el método de clonado y secuenciación por Sanger no era el abordaje apropiado, es así que se decidió desarrollar un método alternativo que permitiera determinar el número de copias de los genes estudiados en las diferentes variedades. Se diseñó un método cuantitativo y específico mediante qPCR, que se puso a punto y se utilizó para el estudio de las variedades. Para ello se diseñaron cebadores en base a los datos obtenidos y los existentes en la base datos del NCBI, se utilizó el kit de extracción de ADN MagMAX Plant DNA Kit (Applied Biosystems), se cuantificó el ADN con el kit Qubit dsDNA BR Assay Kits (Life technology) y se realizó las qPCR con el kit QuantiNova Probe SYBR Green PCR Kit (Qiagen) en un termociclador QuantStudio 3 (Applied Biosystems). De esta forma se pudo estudiar las 23 variedades de Cannabis y la población F1, abarcando la gran diversidad existente entre las muestras. También permitió, en vista de los resultados obtenidos por secuenciación Sanger y datos publicados durante el desarrollo de este proyecto (Laverty \_ 2019; Vergara \_ 2019; McKernan\_2020;Van Velzen \_ 2021), abarcar el estudio de los genes que codifican para CBGAS, CBCAS-like y genes CBDAS-like (además de THCAS y CBDAS). Mediante la estrategia por secuenciación Sanger esto hubiera sido muchísimo más costoso económicamente y laborioso (según los primeros resultados obtenidos en este proyecto, que mostraron que el sistema de los genes estudiados era mucho más complejo de lo esperado según los antecedentes).

El método desarrollado también sirvió de base para diseñar una estrategia de análisis de las expresiones de los genes de interés mediante qPCR. Al disponer de cebadores para detectar de forma específica a cada uno de los genes en estudio, se los pudo utilizar para estudiar las expresiones de los genes de interés (THCAS, CBDAS, CBCAS-like, CBDAS-like y CBGAS) de forma específica. Para el análisis de expresiones, se amplió el número de genes estudiados, incluyendo pseudogenes relacionados a los genes de las cannabinoides sintasas (detectados en este trabajo y en la base de datos), para los cuales se diseñaron cebadores específicos. Para realizar los estudios se extrajo ARN de flores femeninas con el kit PureLink RNA Mini Kit (Ambion) utilizando DNAsa en columna PureLink DNase (invitrogen) y un segundo tratamiento con DNase I (Thermo Fisher) post extracción, se cuantificó el ARN con el kit Qubit RNA BR Assay Kits (Life technology), se realizó las retrotranscripciones con la RevertAid Reverse transcriptase (Thermo Scientific), y se realizó las cuantificaciones con el kit QuantiNova Probe SYBR Green PCR Kit (Qiagen) en un termociclador QuantStudio 3 (Applied Biosystems). Con esta estrategia se estudió la expresión de los genes THCAS, CBDAS, CBCAS-like, CBDAS like, CBGAS y pseudogenes en flores de las variedades de Cannabis de las cuales se disponía de flores hembras (donde se sabe se expresan los genes en estudio). De esta forma, según los patrones de expresión se podría identificar variedades que tuvieran genes que no se expresaran, con las cuales seguir trabajamos para analizar sus patrones epigenéticos y la posible relación de éstos con la expresión. Teniendo caracterizadas las variedades según el perfil de expresión de los genes en estudio y la presencia de estos genes en los genomas, se continuó con análisis epigenéticos.

En una primera instancia se analizó la metilación de 5mC en el ADN de promotores y cuerpos de los genes en estudio, por medio de la digestión con la enzima McrBC. La McrBC corta el ADN en posiciones con 5mC, por lo que al realizar el tratamiento y posteriormente una PCR, el ADN metilado (digerido por McrBC) no se amplifica. Este método permitiría determinar si existe metilación en el ADN, y poder correlacionarla con los niveles de expresión de cannabinoides sintasas, detectados en este trabajo. Se diseñaron cebadores que permitieran amplificar de forma específica una región del cuerpo del gen y promotores de THCAS, CBDAS, y cuerpos de gen de CBCAS-like, CBDAS-like, CBGAS, Chi5 (un control en donde se ha descrito metilación) (McKernan\_2020) y CHS (en donde no hay metilación del ADN). Se estudió ADN de hojas y flores de diferentes variedades obtenido con el kit MagMAX Plant DNA Kit (Applied Biosystems) y cuantificado con el kit Qubit dsDNA BR Assay Kits (Life technology). Se puso a punto el tratamiento con la enzima McrBC (Biolabs), se amplificó por PCR utilizando la Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher) y se detectó la metilación mediante geles de agarosa y tinción con Bromuro de Etidio. Posteriormente, se planteó profundizar en los patrones de metilación, mediante secuenciación por bisulfito de sodio. Esto permitiría determinar con precisión que sitios de los promotores y cuerpo de gen estarían metilados. A su vez, dependiendo del tipo de posiciones en donde se encontrase metilación (CG, CHG o CHH), se podría inferir sobre el mecanismo molecular responsable de la metilación (RdDM u otro). Para ello se diseñaron cebadores específicos que permitieran detectar de forma específica cada región de los diferentes genes a estudiar y un control (CHS), que permitieran además amplificar ADN tras su conversión por bisulfito de sodio. Se puso a punto la técnica utilizando el kit EpiMark Bisulfite Conversion Kit (Biolabs) y la enzima EpiMark Hot Start Taq DNA Polymerase (Biolabs). Los productos de PCR se secuenciaron por Sanger en Macrogen (Corea) y los cromatogramas se analizaron utilizando el programa CLCworkbench (Qiagen).

Para este proyecto también se planteó secuenciar un genoma de Cannabis, de forma de generar un ensamblado de buena calidad y poder estudiar en detalle los genes de interés en una variedad, además de generar un recurso para profundizar en futuros estudios genéticos en Cannabis. Para ello se generó una colaboración con la empresa germinaruy (<https://germinaruy.com/>), quienes desarrollaron la variedad Moca en Uruguay. Disponer del genoma de una variedad con la cual podemos seguir trabajando a nivel genético y de regulación génica es una gran insumo para el equipo de investigación y de interés para la empresa germinaruy. Se extrajo ADN alto peso molecular (HMW) de la variedad Moca, utilizando el kit que utiliza las columnas Qiagen-Genomic-Tips y se secuenció mediante PacBio HiFi en el servicio de secuenciación de la empresa Novogene (Europa). Para el análisis de secuencias y ensamblado del genoma de Moca se estableció una colaboración con el Dr. Brande Wulff de la Universidad de Ciencia y Tecnología Rey Abdalá (Arabia Saudí).

## **Resultados, análisis y discusión**

En la primera etapa de este proyecto se estudió la presencia de las cannabinoides sintasas y sus variantes genéticas mediante un abordaje de amplificación por PCR, clonado y secuenciación por Sanger. Se diseñaron cebadores degenerados que permitieran amplificar a las diferentes THCAS y CBDAS descritas hasta ese entonces, en base a las secuencias disponibles en la base de datos del NCBI. Se estudió la presencia y variantes de THCAS y CBDAS en las primeras ocho variedades donadas para el proyecto, todas ellas variedades ricas en THC. Al analizar las secuencias obtenidas, se detectó una gran variación de secuencias. Llamo la atención el gran número de copias de cannabinoides sintasas detectadas para cada variedad, encontrando hasta 15 secuencias diferentes por genoma. Los datos mostraban mayor variabilidad de la esperada de acuerdo a los antecedentes. En el transcurso del proyecto surgieron nuevas publicaciones que mostraron la existencia de otras cannabinoides sintasas en algunos genomas de cannabis: CBCAS-like y CBDAS-like (Lavery\_2019; Vergara\_2019). Al analizar nuevamente nuestros datos incorporando a la CBCAS-like y CBDAS-like, pudimos constatar que muchas de nuestras secuencias correspondían a CBCAS-like y CBDAS-like (y que muchas secuencias que utilizamos como referencia para diseñar los cebadores no correspondían a THCAS o CBDAS, sino a CBCAS-like y CBDAS-like). En esos primeros estudios observamos que sólo había entre una y dos secuencias correspondientes a THCAS en los genomas estudiados y gran variación en las secuencias de CBCAS-like y CBDAS-like. En vista del gran número de secuencias detectadas para diferentes cannabinoides sintasas, consideramos que el abordaje por clonado y secuenciación Sanger no era adecuado para el volumen de muestras y el presupuesto disponible. Se decidió incorporar a CBCAS-like y CBDAS-like al análisis y cambiar de estrategia para el estudio del número de copias (NC) de las cannabinoides sintasas en los genomas.

Se diseñó un método que permitiera detectar a las diferentes cannabinoides sintasas de forma específica y cuantitativa, basado en qPCR. La altísima identidad entre las secuencias de THCAS, CBDAS y CBCAS (89,8-96%, Hurgobin\_2021) dificulta el diseño de cebadores específicos para cada gen sin detectar a los otros. Mediante un árbol filogenético se analizó los grupos de cannabinoides sintasas, utilizando secuencias obtenidas en el proyecto y disponibles en el NCBI. Se utilizó como

referencia en el árbol a las tres cannabinoides sintasas funcionalmente caracterizadas, THCAS (Sirikantaramas\_2004), CBDAS (Taura\_2007), CBCAS (Lavery\_2019) y dos CBDAS-like (de las cuales no se sabe el cannabinoide que sintetizan) (Taura\_2007). De esta forma se determinaron grupos y se diseñaron cebadores sobre las secuencias consenso de THCAS, CBDAS, CBCAS-like y CBDAS-like, que permitieran distinguir un grupo del otro. En el mismo análisis se detectó secuencias que no agrupaban con ninguna de las cannabinoides sintasas conocidas y además presentaban codones de parada prematuros, que se las considero pseudogenes y se las denominó P1 y P2-3. También se diseñó cebadores específicos para la CBGAS y el gen de copia única CHS (Cascini\_2012), que se utilizó de referencia. Se puso a punto el método para el estudio del NC de genes de cannabinoides sintasas por genoma haploide utilizando dos variedades de las cuales se disponía secuencias por clonado y secuenciación Sanger.

Usando el método desarrollado, se determinó el NC de genes de cannabinoides sintasas en 23 variedades. Para todas las plantas estudiadas, independientemente del quimiotipo declarado, se detectó una copia de CBGAS por genoma haploide (CBGAS presente en ambas cromosomas). Todas las variedades declaradas ricas en THC mostraron el equivalente a una copia de THCAS por genoma haploide, mientras que en las variedades declaradas ricas en CBD o cáñamo no se detectó THCAS. Recíprocamente, en estas últimas, se detectó una copia de CBDAS por genoma haploide y en las variedades declaradas ricas en THC no se detectó CBDAS. En la variedad THC:CBD balanceada, se detectó una copia de THCAS y una copia de CBDAS cada dos genomas haploides (lo que corresponde a un hemicigoto para cada gen en un genoma diploide). En las variedades con supuestos ancestros de la India, se detectó una copia de THCAS en India 1 y 3, y ninguna en India 2. Con CBDAS ocurrió lo contrario, detectándose una copia en India 2 y ninguna en India 1 y 3. Los resultados indican la presencia del equivalente a una copia de THCAS o de CBDAS en cada cromosoma 7 de Cannabis. La presencia de THCAS y CBDAS correlacionó con la capacidad de las variedades para producir THCA o CBDA. Para CBCAS-like y CBDAS-like se detectó un NC variable en los genotipos estudiados, independientemente del quimiotipo declarado. Para CBCAS-like, varió desde ninguno (ausencia) hasta 9 copias por genoma haploide (18 por genoma diploide). CBDAS-like se detectó en todos los genotipos estudiados, con un NC por genoma diploide que osciló entre 4 y 13. A diferencia de THCAS, CBDAS y CBGAS, las CBCAS-like y CBDAS-like nunca se detectaron como copia única.

En este estudio hemos detectado patrones muy diferentes en cuanto a la combinación y NC de genes de cannabinoides sintasas. Se detectaron variedades con THCAS o CBDAS, siendo excluyente la presencia de uno u otro, a excepción de la variedad THC:CBD balanceada, que mostró tener una copia de THCAS y una copia de CBDAS por genoma diploide. A su vez, tanto las variedades con THCAS como las variedades con CBDAS mostraron variación en el número de copias de CBCAS-like, desde ninguna a muchas copias independientemente de que tuvieran THCAS o CBDAS. La cantidad de copias de CBDAS-like varió de manera similar, independientemente de que tuvieran THCAS o CBDAS y si tenían o no CBCAS-like. En cuanto al NC total de cannabinoides sintasas, los resultados mostraron una gran variación, desde 4 hasta 16 por genoma haploide, independientemente de que tuvieran THCAS o CBDAS. Definitivamente, la combinación y el número de cannabinoides sintasas en cada genotipo fue muy variable e impredecible.

Con el fin de ahondar en la distribución y segregación de los genes de las cannabinoides sintasas en el cromosoma 7, se evaluó una población segregante derivada del cruce entre Skunk y CBD-crack. Se analizó el NC de las cannabinoides sintasas en los dos parentales y 34 plantas hijas. En Skunk se detectó para su genoma diploide dos copias de THCAS, ocho copias de CBCAS-like, diez copias de CBDAS-like y ninguna CBDAS. En CBD-crack se detectó para su genoma diploide una copia de THCAS y una copia de CBDAS, siete copias de CBCAS-like y cuatro copias de CBDAS-like. Los resultados sobre el NC de las diferentes cannabinoides sintasas en la progenie se analizaron mediante un análisis de componentes principales (PCA). El primer componente del PCA explicó el 90% de la varianza, con el mayor peso dado por la variable NC de CBCAS-like (97%), y el segundo componente del PCA explicó el 9% de la varianza, con el mayor peso dado por la variable NC de CBDAS-like (91%). En el PCA se detectaron 4 grupos marcados de plantas que coincidían con una segregación Mendeliana: 1-plantas sin CBCAS-like y dos copias de THCAS, 2-plantas con ~7-8 copias de CBCAS-like y dos copias de THCAS, 3-plantas con ~7-8 copias de CBCAS-like junto con una copia de THCAS y una copia de CBDAS, y 4-plantas con ~14-15 copias de CBCAS-like junto con una copia de THCAS y una copia de CBDAS. El primer grupo permitió deducir que tanto Skunk como CBD-crack tenían un cromosoma sin CBCAS-like, en el caso de CBD-crack era el cromosoma que porta THCAS. El resto de grupos apoyan esta deducción. Por otro lado, con el PCA se detectó tres plantas que escaparon a los grupos descritos anteriormente. Se pudo constatar que esas plantas surgieron por recombinaciones en los parentales, detectándose recombinación entre las CBCAS-like y THCAS en CBD-crack, y entre CBCAS-like y CBDAS-like en Skunk. Esta última, permitió deducir la distribución de las CBDAS-like en los parentales. Los datos permitieron deducir la distribución de los genes de las cannabinoides sintasas en los cromosomas de cada parental, mostrando diferencias entre los parentales y



entre cada cromosoma de cada parental: Skunk posee un cromosoma con una copia de THCAS y cuatro copias de CBDAS-like y otro con una copia de THCAS, seis copias de CBDAS-like y ocho copias de CBCAS-like, mientras CBD-crack posee un cromosoma con una THCAS y dos CBDAS-like y el otro con una CBDAS, dos CBDAS-like y siete CBCAS-like. Con tan solo un ejemplo, mostramos existe gran variabilidad en el NC a nivel de cromosoma. Por lo que al estudiar a las cannabinoides sintasas no hay que perder de vista el efecto de cada cromosoma, sobretodo sabiendo que en las variedades de Cannabis que circulan existe un alto porcentaje de heterocigocidad (Gao\_2014;Soler\_2017;Sawler\_2015). Esto es importante en los planes de mejora genética, en dónde se busca plantas con diferentes perfiles de cannabinoides.

Por otro lado, se estudió el nivel de expresión de THCAS, CBDAS, CBCAS-like, CBDAS-like, CBGAS y dos grupos de pseudogenes (P1 y P2-3). Todas las variedades que mostraron tener el gen THCAS y el gen CBDAS los expresaron en altas cantidad (entre 25 y 90 veces más que el "hosuekeeping" CDK3). Curiosamente, para los genes CBCAS-like y CBDAS-like se detectó muy baja expresión o ninguna. En el caso de CBCAS-like, se detectó algunas variedades ricas en CBD con expresión entre 1 y 4,5 veces más que CDK3, en el resto de variedades ricas en CBD o ricas en THC casi no se detectó expresión o no se detectó. En todos los casos se detectó muy baja expresión de CBDAS-like o no se detectó (máximo detectado correspondió a 0,1 veces el nivel de CDK3). Los resultados muestran que las cannabinoides sintasas de copia única en el genoma (THCAS, CBDAS y CBGAS) se expresan en gran cantidad en flor, mientras que las cannabinoides sintasas con múltiples copias (CBCAS-like y CBDAS-like) se expresaron muy poco o no se expresaron. Estas últimas son buenas candidatas para estudiar sus patrones de metilación en el ADN, ya que poseen múltiples copias y algunas se expresan y otras no. Por otro lado, en ambas se detectó copias con codones de parada prematuros que producirían genes no funcionales (o pseudogenes). El estudio de la expresión de P1 y P2-3 mostro una baja expresión, aunque detectable (confirmada por secuenciación Sanger), por lo que también apoya la idea de estudiar metilación del ADN en estos genes.

Tras los resultados obtenidos, se estudió la existencia de metilación en los genes de las cannabinoides sintasas (THCAS, CBDAS, CBCAS-like, CBDAS-like y CBGAS) y controles (Chi5 y CHS). Los resultados han sido alentadores ya que se vio una clara y consistente metilación en los genes de THCAS, CBDAS, CBCAS-like y CBDAS-like en ADN de hoja de todas las variedades estudiadas, mientras que los genes CBGAS y CHS mostraron no estar metilados. Los niveles de metilación de THCAS, CBDAS, CBCAS-like y CBDAS-like fueron menores en ADN de flores, aunque no de igual forma en todas las variedades. Los resultados indican que existe metilación en hoja y variable en flor. Esto se puede deber a diferencias biológicas entre variedades, mezcla de tejidos en las muestras de flores, condiciones de cultivo y cosecha o diferencias en las posiciones de las citosinas metiladas. Para profundizar en esto, se procedió a estudiar la metilación mediante secuenciación por bisulfito de sodio, ya que permite determinar con precisión las citosinas metiladas (CG, CHG o CHH) y con ello se puede inferir sobre los mecanismos de metilación involucrados. El sistema se puso a punto en el laboratorio con éxito, y se están analizando muestras en el marco de una tesis de Maestría en Química.

Por último, se ha secuenciado por Pacbio HiFi el ADN genómico de la variedad Moca de origen uruguayo. El ensamblado del genoma de Moca está en proceso.

## **Conclusiones y recomendaciones**

En este proyecto se ha desarrollado con éxito un método que permite detectar de forma específica el número de copias de cannabinoides sintasas (CBGAS, THCAS, CBDAS, CBCAS-like y CBDAS-like) en genomas de Cannabis.

Con el método desarrollado se mostró una gran variación en el número de copias de cannabinoides sintasas en los genomas de diferentes variedades de Cannabis.

En las variedades estudiadas se ha detectado una gran variación en la combinación de cannabinoides sintasas presentes en los cromosomas. Se ha detectado variedades con una copia de THCAS o CBDAS por cromosoma y variedades con y sin CBCAS-like, independientemente de que tengan o no THCAS o CBDAS. En todas las variedades se ha detectado alguna copia de CBDAS-like.

En todas las variedades estudiadas en donde se detectó THCAS, ésta se expresa en altas cantidades, y en todas las variedades estudiadas en donde se detectó CBDAS, ésta se expresa en altas cantidades.

En todas las variedades estudiadas en donde se detectó CBCAS-like y CBDAS-like, éstas se expresan en muy bajas cantidades o no se expresan.

En base a los resultados obtenidos, el método desarrollado es de gran utilidad para mejoradores genéticos de Cannabis que busquen diferentes perfiles de cannabinoides y quieran estudiar el efecto de cada uno de los genes sobre la síntesis de cannabinoides.

El ADN de los genes THCAS, CBDAS, CBCAS-like y CBDAS-like está metilado en hojas de Cannabis, y metilado en menor medida en flores hembras.

## Referencias bibliográficas

- Abuhasira et al. 2018. Medical use of cannabis and cannabinoids containing products – Regulations in Europe and North America. *European Journal of Internal Medicine* 49; 2–6.
- Agorio et al. 2017. An Arabidopsis Natural Epiallele Maintained by a Feed-Forward Silencing Loop between Histone and DNA. *PLoS Genet* 13(1): e1006551. doi:10.1371/journal.pgen.1006551.
- Bostwick 2012. Blurred Boundaries: The Therapeutics and Politics of Medical Marijuana. *Mayo Clin Proc.* 2012 Feb;87(2):172-86. doi: 10.1016/j.mayocp.2011.10.003.
- Cascini et al. 2012. A real-time PCR assay for the relative quantification of the tetrahydrocannabinolic acid (THCA) synthase gene in herbal Cannabis samples. *Forensic Science International* 217, 134–138.
- Devane et al. 1988. Determination and characterization of Cannabinoid Receptor in rat Brain. *Mol Pharmacol.* 34(5):605-13.
- Devane et al. 1992. Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor. *Science* 258:1946.
- Durand et al. 2012. Rapid establishment of genetic incompatibility through natural epigenetic variation. *Curr Biol.* 22(4):326. doi: 10.1016/j.cub.2011.12.054 PMID: 22285031
- Gao et al. 2014. Diversity analysis in Cannabis sativa based on large-scale development of expressed sequence tag-derived simple sequence repeat markers. *PLoS One.* Oct 20;9(10):e110638. doi: 10.1371/journal.pone.0110638.
- Gaoni & Mechoulam 1964. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society.* 86, 1646-1647.
- Grassa et al. 2021. A new Cannabis genome assembly associates elevated cannabidiol (CBD) with hemp introgressed into marijuana. *New Phytol.* May;230(4):1665-1679. doi: 10.1111/nph.17243.
- Hanikenne et al. 2008. Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of HMA4. *Nature* 453, 391-395.
- Hanus 2009. Pharmacological and Therapeutic Secrets of Plant and Brain (Endo)Cannabinoids. *Medicinal Research Reviews* 29 (2), 213-271
- Henry 2015. Genome-wide analyses reveal clustering in Cannabis cultivars: the ancient domestication trilogy of a panacea. *PeerJ Prepr.* 3: e1980.
- Hillig et al. 2004. A Chemotaxonomic Analysis Of Cannabinoid Variation In Cannabis (Cannabaceae). *American Journal of Botany* 91(6): 966–975.
- Hilling 2005. Genetic evidence for speciation in Cannabis (Cannabaceae). *Generic Resources and Crop Evolution* 52: 161-180.
- Hurgobin et al. 2021. Recent advances in Cannabis sativa genomics research. *New Phytol.* 230(1):73-89. doi: 10.1111/nph.17140.
- Izzo et al. 2012. Inhibitory effect of cannabichromene, a major non-psychoactive cannabinoid extracted from Cannabis sativa, on inflammation-induced hypermotility in mice. *Br J Pharmacol* 166: 1444–1460. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01879.x
- Kinghorn et al. 2017 *Phytocannabinoids.* Springer.
- Kojoma et al. 2006. DNA polymorphisms in the tetrahydrocannabinolic acid (THCA) synthase gene in “drug-type” and “fiber-type” Cannabis sativa L. *Forensic Science International* 159 132–140.
- Kovalchuk et al. 2020. The Genomics of Cannabis and Its Close Relatives. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2020. 71:20.1–20.27.
- Leverly et al. 2019. A physical and genetic map of Cannabis sativa identifies extensive rearrangements at the THC/CBD acid synthase loci. *Genome Res.* 29(1):146-156. doi: 10.1101/gr.242594.118.
- Maa & Paige 2014. The case for medical marijuana in epilepsy. *Epilepsia,* 55(6):783–786. doi: 10.1111/epi.12610.
- Maione et al. 2011. Non-psychoactive cannabinoids modulate the descending pathway of antinociception in anaesthetized rats through several mechanisms of action. *Br J Pharmacol* 162: 584–596. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01063.x
- Manning et al. 2006. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nat Genet.* 38(8):948±52. Epub 2006/07/13. doi: 10.1038/ng1841
- Maron et al. 2013. Aluminum tolerance in maize is associated with higher MATE1 gene copy number. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(13): 5241–5246.
- Martin et al. 2009. A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon. *Nature.* 461(7267):1135-1138. doi: 10.1038/nature08498
- McKernan et al. 2015. Single molecule sequencing of THCA synthase reveals copy number variation in modern drug-type Cannabis sativa L. 2015. bioRxiv 028654; doi: <https://doi.org/10.1101/028654>
- McKernan et al. 2020. Sequence and annotation of 42 cannabis genomes reveals extensive copy number variation in cannabinoid synthesis and pathogen resistance genes. bioRxiv 2020.01.03.894428; doi:

<https://doi.org/10.1101/2020.01.03.894428>

- McPartland et al. 2015. Are cannabidiol and 9-tetrahydrocannabivarin negative modulators of the endocannabinoid system A systematic review. *British Journal of Pharmacology* 172 737–753 737.
- Mechoulan et al. 2014. Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nature Review* 15:757.
- Miura et al. 2009. An Arabidopsis jmjC domain protein protects transcribed genes from DNA methylation at CHG sites. *EMBO J.* 2009; 28(8):10781086. doi: 10.1038/emboj.2009.59
- Mücke et al. 2018. Systematic review and meta-analysis of cannabinoids in palliative medicine. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2018; 9: 220–234
- Onofri et al. 2015. Sequence heterogeneity of cannabidiolic- and tetrahydrocannabinolic acid-synthase in *Cannabis sativa* L. and its relationship with chemical phenotype *Phytochemistry* 116 57–68
- Perucca et al. 2017. Cannabinoids in the Treatment of Epilepsy: Hard Evidence at Last? *Journal of Epilepsy Research* 7:62.
- Russo et al. 2011. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology* (2011) 163 1344–1364
- Russo et al. 2017. Cannabis Pharmacology: The Usual Suspects and a Few Promising Leads. *Advances in Pharmacology* 80, 67.
- Russo & Guy 2006. A tale of two cannabinoids: The therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Medical Hypotheses* 66, 234–246.
- Sawler et al. 2015. The Genetic Structure of Marijuana and Hemp. *PLoS One*. 10(8):e0133292. doi: 10.1371/journal.pone.0133292.
- Shinjo et al. 2013. The effect of cannabichromene on adult neural stem/progenitor cells. *Neurochem Int* 63: 432–437. doi:10.1016/j.neuint.2013.08.002
- Sirikantaramas et al. 2004. Molecular cloning and heterologous expression of Tetrahydrocannabinolic acid Synthase from *Cannabis sativa*. *The Journal of Biological chemistry*, 279 (38).
- Soler et al. 2017. Genetic structure of *Cannabis sativa* var. *indica* cultivars based on genomic SSR (gSSR) markers: Implications for breeding and germplasm management. *Industrial Crops and Products*, Vol. 104, 171-178. doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.043.
- Sutton et al. 2007. Boron-Toxicity Tolerance in Barley Arising from Efflux Transporter Amplification. *Science* 318, 5855. 1446-1449 DOI: 10.1126/science.1146853.
- Taura et al. 2007. Production of D1-tetrahydrocannabinolic acid by the biosynthetic enzyme secreted from transgenic *Pichia pastoris*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 361, 675–680.
- Van Velzen et al. 2021. Origin and Evolution of the Cannabinoid Oxidocyclase Gene Family. *Genome Biol Evol*, 13(8):evab130. doi: 10.1093/gbe/evab130.
- Vergara et al. 2017. Genetic and Genomic Tools for *Cannabis sativa*, *Critical Reviews in Plant Sciences*, DOI: 10.1080/07352689.2016.1267496.
- Weiblen et al. 2015. Gene duplication and divergence affecting drug content in *Cannabis sativa*. *New Phytologist* 208: 1241–1250 doi: 10.1111/nph.13562.
- Welling et al. 2016. Characterisation of cannabinoid composition in a diverse *Cannabis sativa* L. germplasm collection. *Euphytica* 208:463–475 DOI 10.1007/s10681-015-1585-y.
- Wenger et al. 2020. Validating a predictive model of cannabinoid inheritance with feral, clinical, and industrial *Cannabis sativa*. *Am J Bot.* 2020 Oct;107(10):1423-1432. doi: 10.1002/ajb2.1550.

## Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)