

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN CANNABIS

Institución donde se llevará adelante el proyecto: Instituto de Investigaciones Biológicas, Unidad Ejecutora de doble dependencia Universidad Nacional de Mar del Plata-CONICET y Depto. de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata.

Investigadora responsable: Silvana L. Colman

Título del proyecto

Caracterización de germoplasma local de Cannabis y desarrollo de nuevas herramientas genéticas aplicadas al estudio de su diversidad, identificación y selección.

Objetivo general

Caracterizar clones y variedades de *Cannabis sativa* y desarrollar herramientas genómicas para el estudio de su diversidad, identidad, trazabilidad y selección.

Objetivos específicos

1. Caracterizar clones y variedades locales de *Cannabis sativa* en relación a parámetros morfoanatómicos, agronómicos y químicos.
2. Realizar un análisis genómico del germoplasma de cannabis utilizado en distintos proyectos de investigación de nuestro país.
3. Generar y validar herramientas genéticas para la clasificación, diferenciación, identificación, selección y trazabilidad de las variedades locales de Cannabis.

*Definición de los conceptos utilizados:

Clasificar: ordenar o dividir a los genotipos por su similitudes/diferencias genotípicas e intentar determinar la clase o grupo al cual pertenecen.

Diferenciar: discriminar un clon o variedad de otra a través del análisis de la presencia o ausencia de los distintos alelos de marcadores que presentan.

Identificar: inferir la autenticidad de un clon o variedad por las características de su perfil genético.

Seleccionar: elegir una planta a partir de la variante genética observada en su genotipo, la cual se relaciona a un rasgo fenotípico de interés.

Trazabilidad: a través de la utilización de marcadores moleculares, rastrear con precisión el camino que recorre la planta en la cadena productiva y/o durante la posible comercialización.

Descripción detallada de las actividades que se prevén desarrollar en el marco del proyecto

Cannabis sativa L. es un importante cultivo medicinal e industrial perteneciente a las Cannabaceae. Es una planta herbácea anual principalmente dioica y esporádicamente monoica (Hesami et al., 2020). Si bien es un cultivo de alto valor, debido a la larga historia de prohibición (Musto, 1972), existe una falta significativa de investigación sobre la planta y las técnicas biotecnológicas aún están en sus inicios.

Actualmente, el avance hacia la legalización del cannabis permite el desarrollo de nuevas investigaciones para conocer las propiedades y potenciales efectos de los distintos compuestos de la planta, a fin de determinar sus posibilidades de aplicación en diversos usos. El principal interés está en el campo medicinal y recreacional, aunque existen otras aplicaciones que incluyen cosméticos, fibras textiles, ropa y calzado, biocombustibles, alimentación, materiales de construcción, papel, fertilizantes, partes automotrices y bioplásticos, entre otras (Lopez et al., 2021). Teniendo en cuenta todos sus usos potenciales, la producción agrícola de cannabis tiene como objetivo obtener plantas, considerando las flores, hojas, semillas, tallo e inclusive la raíz, con las

características apropiadas según los usos que posteriormente se le dará a la biomasa. De esta manera, en función de los objetivos buscados es necesario definir la combinación específica de compuestos activos en las distintas partes de la planta, lo cual se relaciona con su genética y con las condiciones agronómicas con las que haya sido cultivada.

La producción de metabolitos secundarios en el cannabis es muy alta en comparación con otras plantas (Danziger y Bernstein, 2021), representando un 16% del peso seco, comparado con un 0,05% en rosas, 0,4% en salvia, 0,8% en albahaca dulce y 0,1–2,0% en lúpulo (Trancoso et al., 2022). *Cannabis sativa* contiene más de 400 compuestos químicos, los cuales aparecen en diferentes proporciones según la variedad. Entre ellos, más de 60 son fitocannabinoides, siendo el delta-9- tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) y el cannabidiol (CBD) los más abundantes (Fisar, 2009). Además, produce una gran diversidad de terpenos, azúcares, esteroides, flavonoides y compuestos nitrogenados. La concentración de cannabinoides que una planta de cannabis desarrolle –así como también la de terpenos y flavonoides–, va a estar asociada a sus características genotípicas, aunque fuertemente afectada por las condiciones agroecológicas a las cuales sea sometida la planta durante su proceso de crecimiento (Radwan et al., 2017). Las enzimas que sintetizan los cannabinoides más estudiados, THC y CBD, son la THC y CBD sintetas (CBDAS y THCAS) y su estructura genética ha sido recientemente elucidada (Lavery y col., 2019). Mientras que sus genes poseen un 84% de identidad en la secuencia de aminoácidos (Onofri y col., 2015), no son un loci equivalente. Sin embargo, los scaffolds que los contienen están ligados físicamente en repulsión llevando a una baja recombinación (Lavery y col., 2019). Como consecuencia, la herencia del quimiotipo cannabinoide puede ser considerada como monogénica, con plantas produciendo predominantemente THC (quimiotipo 1 BT/BT), similares cantidades de CBD y THC (quimiotipo 2 BT/BD) o predominantemente CBD (quimiotipo 3 BD/BD) (de Meijer y col., 2003; Mandolino y col., 2003).

En cuanto a sus características morfoanatómicas, *C. sativa* es una especie cuyas variedades exhiben una morfología muy diversa respecto a la altura de la planta, el tamaño y la ramificación del tallo, el área foliar junto con la forma y número de lóbulos, y el número y forma de las flores, inflorescencias y frutos. Esto se debe a la intervención del hombre en el cultivo artesanal de la planta, a la hibridación genética y a una fuerte selección de los fenotipos y quimiotipos deseados. Existen varios estudios morfológicos de *C. sativa* (Small y col, 2003; Spitzer-Rimon y col, 2019), aunque la mayoría de ellos están enfocados a las características de los tricomas (Hammond y Mahlberg, 1977; Raman y col, 2017).

Hoy en día, existen cientos de variedades alrededor del mundo que varían en función de sus aromas, tamaño, composición química, formas de cultivo y características del suelo y clima; estas, a su vez, tienen diferentes rendimientos, aplicaciones y propiedades.

Particularmente en Argentina, tanto usuarios como ONGs vienen cultivando cannabis desde hace varios años, lo que llevó a la existencia de una gran diversidad de genéticas locales que constituyen un germoplasma con potencial riqueza de componentes activos. En este sentido, el nuevo decreto reglamentario 883/20 incorporó el Registro del Programa de Cannabis, en el cual los pacientes pueden obtener la autorización para cultivar, legitimando el autocultivo de variedades locales. Asimismo, la investigación y desarrollo de genéticas locales es impulsado por el Estado Nacional a través de la reciente sanción de la Ley de Producción de Cannabis Medicinal y Cáñamo Industrial 27.669 y las Resoluciones 140/2021 y 260/2022, donde se encomienda al INASE identificar, caracterizar y registrar el germoplasma nacional. Además, el Ministerio de Desarrollo Productivo, en su Informe “La cadena de valor del cannabis: situación y tendencias internacionales, y oportunidades para la Argentina”, pone en relevancia que “Alentar el desarrollo de variedades locales es clave considerando que uno de los desafíos del sector a nivel global es perfeccionar el desarrollo de genéticas capaces de producir de forma estable las composiciones buscadas de cannabinoides.” Esta

ampliación del marco regulatorio abrió la posibilidad para que los usuarios medicinales puedan cultivar de forma legal y por otro lado, propició la generación de proyectos productivos en distintas provincias del país. En ambos casos, se hace indispensable contar con variedades locales de cannabis caracterizadas para producir de manera estable la composición de cannabinoides buscada.

En este proyecto, por un lado, planteamos realizar la caracterización de variedades locales de *C. sativa* con el objetivo de conocer, diferenciar y, posteriormente, conservar genotipos de interés para su posible incorporación en planes de fitomejoramiento. Esto permitirá generar nuevos clones y variedades, su registro en INASE y su incorporación en bancos de germoplasma nacionales, y por otro lado, posibilitará su utilización por usuarios medicinales y proyectos productivos.

Nuestro grupo de investigación Biología de Cannabis, ha comenzado a trabajar en la caracterización morfoanatómica y genética de clones de *Cannabis sativa* que vienen siendo utilizados de forma terapéutica por usuarios pertenecientes a la Agrupación Marplatense de Cannabicultores Asociación Civil. A partir de este material, pusimos a punto las condiciones de cultivo y técnicas para realizar su caracterización preliminar a nivel morfológico-anatómico, genético, el análisis de la concentración de THC y CBD, y seleccionamos algunos clones de interés por su composición y crecimiento.

Hemos presentado dos trabajos en congresos en relación a este tema:

- Caracterización morfoanatómica y genética de cuatro variedades locales de *Cannabis sativa*. Encuentro Biólogos en Red, Universidad Nacional de Mar del Plata. 14-15 de noviembre de 2022.
- Caracterización morfológica, genética y química de variedades locales de cannabis de uso terapéutico. Congreso de Cannabis -2021: 2do Congreso Argentino de Cannabis y Salud, 3er Encuentro Americano de Profesionales Expertos en Fitocannabinoides. Chilecito, La Rioja. 30, 1 y 2 de Octubre de 2021.

Esta línea de trabajo se inició a través de la adjudicación de un PICT2020 A inicial, a la investigadora responsable del presente proyecto y que se denomina: Desarrollo de herramientas genéticas para la caracterización y el estudio de cepas de cannabis. En este marco se está realizando una tesina de grado y se solicitó una Beca Doctoral de CONICET.

En esta convocatoria, tenemos como objetivo realizar una caracterización completa de los clones seleccionados incluyendo características agronómicas como desarrollo de biomasa aérea y radicular, distintos índices de crecimiento como, área foliar, clorofila, altura de la planta, número de nudos, producción de flores, rendimiento de resina, y demás caracteres incluidos en el descriptor de variedades del INASE. Se profundizará en las técnicas anatomo-morfológicas ensayadas preliminarmente, intentando describir aquellas relacionadas al rendimiento de resina y a la diferenciación entre las variedades. Además, se realizará un análisis completo de la composición química de cannabinoides y terpenos.

Teniendo en cuenta que las características fenotípicas del cultivo son a menudo influenciadas por el medio ambiente, en este proyecto nos centraremos en el desarrollo de herramientas genéticas útiles para la clasificación, diferenciación, identificación, selección y trazabilidad de las variedades locales de cannabis. De esta manera, podemos complementar la caracterización e identificación de plantas utilizando marcadores moleculares, ya que son relativamente más estables y populares que los marcadores morfológicos (Nadeem et al., 2018).

Actualmente, hay muchos estándares para clasificar al cannabis. Desde una perspectiva utilitaria, el cannabis se clasifica en cuatro tipos, silvestre, para fibra, para semillas oleaginosas y como psicoactivo. Taxonómicamente, el cannabis se reconoce como cáñamo y marihuana. Según el grado de domesticación, el cannabis se clasifica en tipos silvestre, domesticado e intermedio (Chandra et al., 2017). Estudios previos demuestran una diversidad genética sustancial entre las líneas de marihuana y cáñamo, no sólo en

las regiones del genoma relacionadas a la producción de THC y CBD (Sawler et al., 2015). Hay variaciones morfológicas considerables entre los tipos de cannabis silvestre y cultivado; además, *C. sativa* es menos variable y relativamente más homogénea que cannabis índica (Lynch et al., 2016). Las herramientas para explorar el genoma del cannabis se han investigado durante varias décadas a través del uso de marcadores moleculares para identificar fenotipos sexuales y factores determinantes de quimiotipos y dilucidar la diversidad genética de sus subespecies (Mandolino y Carboni, 2004).

La diversidad genética se puede utilizar para evaluar la evolución y conservación de las variedades (Ellegren y Galtier, 2016). Los eventos de endogamia y evolución podrían alterar la frecuencia alélica y reducir la diversidad genética. Por lo tanto, es vital estimar con precisión la correlación entre los diferentes recursos de germoplasma para garantizar una utilización y manejo de alta eficiencia y para mantener una variabilidad genética adecuada para el mejoramiento de variedades de plantas (Nderu et al., 2019). Particularmente, para el estudio de la diversidad genética de distintas especies, los marcadores microsatélites (SSRs) son elegidos frente a otros marcadores moleculares por las ventajas de ser simple locus con múltiples alelos, codominantes, altamente informativos, reproducibles, y tener un alto poder de discriminación (Morgante y Olivieri, 1993; Rafalski, 1996; Powell y col., 1996; Jones y col., 1997). Además, esta técnica robusta se puede distribuir fácilmente entre diferentes laboratorios a través del conocimiento de sus secuencias de cebadores (Litt y Luty, 1989). Los SSRs también se pueden usar en PCR multiplex donde se pueden ensayar varios loci de microsatélites en la misma reacción de amplificación. Debido a estas ventajas, los SSRs se han convertido en una herramienta muy adecuada para una amplia gama de aplicaciones en genética como identificación de genotipo (Ashkenazi y col., 2001), evaluación de la pureza de las semillas y conservación y selección del germoplasma (Goldstein y col., 1995; Brown y col., 1996). En particular, en cannabis se han desarrollado marcadores SSRs para la caracterización de diferentes variedades, para el análisis de poblaciones de plantas y también para estudios forenses (Gilmore y Peakall 2003; Howard y col., 2008; Gao y col., 2014).

Con nuestro grupo de trabajo hemos comenzado a explorar la diversidad genética de clones que están siendo utilizados de forma terapéutica por usuarios de la AMC A.C. En esta primera aproximación encontramos que 5 SSRs estudiados fueron capaces de diferenciar a 3 de los 4 clones analizados por sus perfiles electroforéticos (Fig. 1). Estos resultados fueron incluidos en las presentaciones a congresos mencionadas previamente y ponen en evidencia la factibilidad del uso de estos marcadores para la clasificación, diferenciación, identificación y trazabilidad de cannabis.

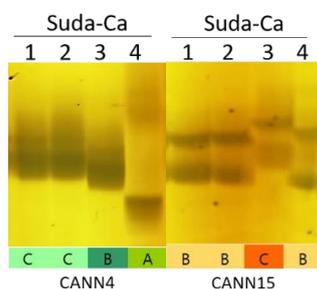


Fig. 1. Patrones electroforéticos revelados por dos SSRs (iniciadores de Gilmore and Peakall, 2003) en 4 clones de cannabis locales denominados Suda-Ca 1, 2, 3 y 4. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida teñidos con plata según Bembouza et al., 2006. Las letras debajo indican los patrones electroforéticos identificados.

Con la secuenciación completa del genoma y del transcriptoma del cannabis publicado en 2011 (Bakel y col., 2011), se ampliaron las posibilidades de generar nuevos marcadores SSRs a partir de EST (expressed sequence tags) de manera rápida y económica. La ventaja de estos marcadores es que pueden estar ligados a genes que confieren importantes rasgos agronómicos siendo útiles para la selección asistida por

marcadores (Gao y col., 2014). Particularmente, el sexo de la planta y el quimiotipo cannabinoide son rasgos cualitativamente importantes para los productores y mejoradores, ya que la producción máxima de cannabinoides ocurre en plantas femeninas. Estos caracteres son difíciles de fenotipar en plantas jóvenes. Hasta el inicio de la floración, las plantas masculinas y femeninas son fenotípicamente indistinguibles, y las plantas inmaduras producen cantidades relativamente pequeñas de cannabinoides. El quimiotipo cannabinoide de plantas inmaduras también puede no reflejar el perfil de cannabinoides de plantas maduras (de Meijer y col., 2009; Pacifico y col., 2008). Los marcadores moleculares pueden dar respuesta a estos desafíos, ya que el ADN de plantas muy jóvenes se puede utilizar en ensayos de genotipo fiables.

En esta presentación planteamos realizar un análisis genómico de variedades y clones de cannabis que están siendo utilizados en proyectos de investigación y ONGs de nuestro país para aumentar el número de marcadores moleculares disponibles para el estudio de esta especie. Para llevar a cabo este objetivo, utilizaremos la tecnología de secuenciación genómica fraccionada o análisis de secuenciación RAD de doble digestión (ddRAD-Seq). Esta estrategia está diseñada para identificar y calificar de manera eficiente las variantes genéticas en cualquier genoma y luego inspeccionar los fragmentos resultantes en busca de variantes de polimorfismos de nucleótido simple (SNP) utilizando la secuenciación de ADN de próxima generación, lo que permite el desarrollo de cientos a decenas de miles de marcadores genéticos de forma rápida y efectiva. Así, a partir del análisis de ddRAD-Seq, nos proponemos identificar sitios polimórficos y desarrollar marcadores genómicos para cannabis a partir de las variedades locales.

Este desarrollo innovador para cannabis en nuestro país nos permitirá generar las herramientas genéticas para llevar a cabo los objetivos 2 y 3 de este proyecto permitiendo clasificar, diferenciar, identificar y tener trazabilidad del germoplasma y nos permitirá evaluar la diversidad del material vegetal presente en nuestro país. Además, la información genómica obtenida nos abre la posibilidad de estudios de asociación amplia del genoma (GWAS), vinculación y mapeo de loci ligados a caracteres cuantitativos (QTLs) y de esta manera poder desarrollar marcadores para seleccionar rasgos fenotípicos a través del ADN. Así, el desarrollo y la aplicación de técnicas genéticas modernas al cannabis ayudará a superar algunos desafíos específicos de la especie para aumentar la productividad y mejorar nuestro conocimiento sobre esta planta y también particularmente sobre el germoplasma local.

Descripción detallada de la estrategia metodológica prevista

Material Vegetal: se utilizarán los genotipos de cannabis planteados en el proyecto recientemente aprobado: PICT-2020-SERIEA-03535. Este material proviene de esquejes identificados donados por la Agrupación Marplatense de Cannabicultores A.C. y representan genotipos que vienen siendo utilizados en los últimos años por usuarios de cannabis terapéutico.

Para el análisis genómico del objetivo 2 se utilizará, además, material genético de clones y variedades de distintos proyectos de investigación y fitomejoramiento que se están llevando a cabo en el país y de distintas asociaciones civiles, algunos de los cuales ya prestaron su consentimiento y están detallados en la Tabla del punto 4. Para tal fin, se firmará un acuerdo de transferencia de material (ATM) y un convenio de confidencialidad de datos.

Condiciones de cultivo: los ensayos se realizarán en una cámara de cultivo de 12 x 2,5 mt., que contiene dos cuartos aislados con condiciones de luz, temperatura y humedad controladas. Se utilizará iluminación con luces LED 400 w/m² (Hell OSRAM) de corriente continua (Fig. 2). Las plantas serán cultivadas en macetas de 5 lt con sustrato Growmix Multipro. Para la caracterización de los genotipos se utilizará un fotoperiodo 18:6 luz: oscuridad durante el periodo vegetativo de 6 semanas y de 12:12 luz: oscuridad durante

el periodo de floración hasta el final del cultivo. Los valores de humedad relativa se mantendrán en un rango de 50-70% y la temperatura de cultivo será de 25 °C.



Fig. 2. Cámara de cultivo perteneciente al grupo de Investigación Biología Cannabis y plantas de Cannabis de diferentes quimiotipos con las que se llevan adelante los diferentes proyectos de investigación.

Caracterización morfoanatómica: se realizará la caracterización morfológica de las variedades de cannabis siguiendo los descriptores publicados por el Instituto Nacional de Semillas (INASE, 2021). La evaluación anátomo-morfológica incluirá la descripción de la morfología general (descripción de plantas: altura, ángulo de ramificación, disposición foliar, tipo de inflorescencia compuesta), y la morfoanatomía comparada de las hojas y flores de las variedades, incluyendo especialmente el análisis de la anatomía foliar y la epidermis floral y foliar. Se realizará la herborización de parte del material de estudio para ser mantenido como material de referencia. Además, se realizará el análisis histoquímico de las hojas y el tallo de las distintas variedades, utilizando colorantes como Lugol, Sudán III, Azul de Cresil y Cloruro férrico. Se utilizarán réplicas del material a analizar.

Se utilizará material fresco para realizar cortes a mano alzada y análisis histoquímico, y material conservado para el análisis anatómico. El material vegetal se fijará y conservará en FAA (50ml alcohol etílico, 35ml agua destilada, 10 ml formaldehído y 5 ml ác. acético glacial) (D'Ambrogio de Argüeso, 1986). Posteriormente se llevará a cabo la inclusión en parafina sintética (Paraplast) y montaje de dicho material (Ruzin, 1999). El procedimiento incluirá: "deshidratado" en concentraciones crecientes de alcohol etílico (40°, 60°, 80°, 96° y 100°), "transparentado" con concentraciones crecientes de xilol (alcohol: xilol, 3:1, 1:1, 1:3), e "inclusión" con concentraciones crecientes de parafina (xilol:parafina, 3:1, 1:1, 1:3). El material incluido se montará en tacos de madera. Luego, se realizarán cortes en sección delgada con diferentes clases de micrótomos (rotatorio tipo Minot y/o criótomo) para la observación de tejidos. Con este fin, se utilizarán

diferentes colorantes y marcadores celulares, para teñir o marcar diferentes tejidos vegetales, y se analizará el material obtenido con microscopios de campo claro y/o confocal.

Caracterización agronómica: al final de cada ensayo de cultivo (final de la floración) previamente descrito, se analizará la producción de biomasa vegetal por determinación del peso fresco y seco, aéreo (tallos y hojas), radical y de inflorescencias. La biomasa será secada en estufa a 60 °C hasta peso constante y el peso seco de flores se estimará en cámara de secado a 20 °C. Se medirá clorofila con SPAD (Minolta, Japan).

Análisis del rendimiento de resina y caracterización química: el análisis de la resina se realizará por extracción alcohólica en frío, siguiendo el protocolo de Citti et al., (2016) modificado y puesto a punto en el proyecto EXA 1006/20 UNMDP. El solvente será removido con vacío utilizando un rotavapor (Dragon Lab RE-100 PRO). Se determinará la masa de resina producida por planta y por metro cuadrado de cultivo. Los compuestos activos (THC, CBD, CBN) serán analizados en el equipo Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC-DAD) Prominence SHIMADZU. Los terpenos se analizarán a través del servicio de Cromatógrafo gaseoso acoplado a un detector de masas del Departamento de Química de la FCEyN-UNMDP.

Análisis genético con marcadores microsatélites: se seleccionarán marcadores microsatélites de la bibliografía (Gilmore y Peakall 2003; Alghanim y Almirall, 2003). A partir de las plántulas se extraerá ADN de hoja de cada genotipo, según Haymes et al. (1996). Las reacciones de amplificación se realizarán con 50 ng de ADN genómico y serán adaptadas a las condiciones requeridas por los iniciadores. Los productos de amplificación serán confirmados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %. Luego serán sometidos a electroforesis en geles verticales de poliacrilamida desnaturalizantes. El resultado se visualizará por tinción con plata siguiendo el protocolo descrito por Bembouza et al. (2006). Se analizará el número de alelos y haplotipos por locus de microsatélite analizado.

Análisis genómico del germoplasma por ddRAD-Seq: se enviará una placa con alrededor de 90 muestras de material genético purificado y libre de enzimas de restricción al servicio de secuenciación. Las secuencias crudas recibidas, se procesarán utilizando el paquete ipyrad (Eaton & Overcast, 2020) para el demultiplexado y la obtención de las variantes genéticas (SNPs). Con los datos obtenidos se realizarán análisis genéticos poblacionales como RAXML, STRUCTURE, PCA, mrbayes, etc, para la descripción del germoplasma. Se seleccionarán marcadores para el desarrollo de kit de identificación genética de cannabis y estudios de análisis de asociación (GWAS).

Bibliografía:

- Alghanim, H. J., & Almirall, J. R. (2003). Development of microsatellite markers in *Cannabis sativa* for DNA typing and genetic relatedness analyses. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376(8), 1225-1233.
- Ashkenazi V, Chani E, Lavi U, Levy D, Hillel J, Veilleux RE (2001). Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses. *Genome* 44:50–62.
- Bakel HV, Stout JM, Cote AG, Tallon CM, Sharpe AG, y col. (2011). The draft genome and transcriptome of *Cannabis sativa*. *Genome Biology* 12: R102.
- Bembouza H, Jacquemin JM, Baudoin JP, Mergeai G. (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 10 (2):77 – 81.
- Brown SM, Hopkins MS, Mitchell SE, Senior ML, Wang TY, Duncan RR, Gonzalez-Candelas F, Kresovich S (1996). Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Theor. Appl. Genet.* 93:190–198.
- Chandra, S., Lata, H., & ElSohly, M. A. (Eds.). (2017). *Cannabis sativa L.-botany and biotechnology*. Springer.
- Colman S. L. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas "Contribución alélica de genes candidatos al endulzamiento inducido por frío en papa (*Solanum tuberosum* L.)" (2015). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata.

Colman S. L. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas "Variabilidad alélica de invertasas y su asociación al endulzamiento inducido por frío en papa (*Solanum tuberosum* L.)" (2009). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata.

Colman SL, Divito S, Digilio A, Monti C, Feingold SE. (2010) Marcadores funcionales asociados al endulzamiento inducido por frío en papas nativas de Argentina. *Revista de la Asociación Latinoamericana de la papa (ALAP)*. 15(1): 61-65. ISSN: 1019-6609.

Colman, S. L., Massa, G. A., Carboni, M. F., & Feingold, S. E. (2017) Cold sweetening diversity in Andean potato germplasm from Argentina. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(14), 4744-4749.

D'Ambrogio de Argüeso A. (1986). *Manual de técnicas en histología vegetal*. Buenos Aires: Hemisferio Sur S.A. pp. 83.

Danziger N, Bernstein N (2021). Plant Architecture Manipulation Increases Cannabinoid Standardization in Drug-Type Medical Cannabis. *Ind. Crops Prod.*, 167.

de Meijer, E. P., Bagatta, M., Carboni, A., Crucitti, P., Moliterni, V. C., Ranalli, P., & Mandolino, G. J. G. (2003). The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. *Genetics*, 163(1), 335–346.

de Meijer, Hammond y Micheler, 2009; Pacifico, Miselli, Carboni, Moschella y Mandolino, 2008 en Toth, J. A., Stack, G. M., Cala, A. R., Carlson, C. H., Wilk, R. L., Crawford, J. L., ... & Smart, L. B. (2020). Development and validation of genetic markers for sex and cannabinoid chemotype in *Cannabis sativa* L. *GCB Bioenergy*, 12(3), 213-222.

Eaton DAR & Overcast I. (2020). ipyrad: Interactive assembly and analysis of RADseq datasets." *Bioinformatics*. <https://ipyrad.readthedocs.io/> Ellegren, H., & Galtier, N. (2016). Determinants of genetic diversity. *Nature Reviews Genetics*, 17(7), 422-433.

Gao, C., Xin, P., Cheng, C., Tang, Q., Chen, P., Wang, C., ... & Zhao, L. (2014). Diversity analysis in *Cannabis sativa* based on large-scale development of expressed sequence tag-derived simple sequence repeat markers. *PLoS one*, 9(10), e110638.

Gilmore, S., & Peakall, R. (2003). Isolation of microsatellite markers in *Cannabis sativa* L. (marijuana). *Molecular Ecology Notes*, 3(1), 105-107.

Goldstein, D.B., Linares, A.R., Cavalli-Sforza, L.L., and Feldman, M.W. (1995). An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics*, 139:463–471.

Hammond, C. T. & Mahlberg, P. G. (1973) Morphology of glandular hairs of *Cannabis sativa* from scanning electron microscopy. *American Journal of Botany* 60 (6): 524-528.

Haymes KM. (1996). Mini-prep method suitable for plant breeding programs. *Plant Mol. Biol. Rep.* 14:280–284.

Hesami, M., Pepe, M., Alizadeh, M., Rakei, A., Baiton, A., & Jones, A. M. P. (2020). Recent advances in cannabis biotechnology. *Industrial Crops and Products*, 158, 113026.

Howard, C., Gilmore, S., Robertson, J., & Peakall, R. (2008). Developmental validation of a *Cannabis sativa* STR multiplex system for forensic analysis. *Journal of forensic sciences*, 53(5), 1061-1067.

Lavery, K. U., Stout, J. M., Sullivan, M. J., Shah, H., Gill, N., Holbrook, L., ..., Page, J. E. (2019). A physical and genetic map of *Cannabis sativa* identifies extensive rearrangements at the THC/CBD acid synthase loci. *Genome Research*, 29(1), 146–156.

Litt, M., & Luty, J. A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American journal of human genetics*, 44(3), 397.

López, A. La cadena de valor del cannabis: situación y tendencias internacionales, y oportunidades para la Argentina (2021). Consejo para el Cambio Estructural - Ministerio de Desarrollo Productivo de la Nación.

Lynch, R. C., Vergara, D., Tittes, S., White, K., Schwartz, C. J., Gibbs, M. J., ... & Kane, N. C. (2016). Genomic and chemical diversity in *Cannabis*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 35(5-6), 349-363.

Mandolino, G., & Carboni, A. (2004). Potential of marker-assisted selection in hemp genetic improvement. *Euphytica*, 140(1), 107-120.

Mandolino, G., Bagatta, M., Carboni, A., Ranalli, P., & de Meijer, E. (2003). Qualitative and quantitative aspects of the inheritance of chemical phenotype in *Cannabis*. *Journal of Industrial Hemp*, 8(2), 51–72.

Monte MM*, Rey Burusco MF*, Carboni MF,...., Colman SL, Massa GA, Colavita ML, Feingold SE. (2018). Genetic diversity in Argentine Andean Potatoes by means of functional markers. *American Journal of Potato Research*, 95(3), 286-300. * ex aequo

Morgante and Olivieri, 1993; Rafalski, 1996; Powell y col., 1996; Jones y col., 1997 en Alghanim, H. J., & Almirall, J. R. (2003). Development of microsatellite markers in *Cannabis sativa* for DNA typing and genetic relatedness analyses. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376(8), 1225-1233.

Musto, D. F. (1972). The 1937 marijuana tax act. *Archives of General Psychiatry*, 26(2), 101-108.

Nadeem, M. A., Nawaz, M. A., Shahid, M. Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., ... & Baloch, F. S. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(2), 261-285.

Nderu, D et al. (2019) en Zhang, J., Yan, J., Huang, S., Pan, G., Chang, L., Li, J., ... & Li, D. (2020). Genetic diversity and population structure of cannabis based on the genome-wide development of simple sequence repeat markers. *Frontiers in genetics*, 11, 958.

Descripción detallada de los resultados esperados del proyecto

Mediante la realización de este proyecto se espera generar y optimizar herramientas adecuadas y eficientes para la caracterización de variedades de cannabis a distintos niveles: desde la morfología y la anatomía de las plantas y la determinación de su

quimiotipo cannabinoide, hasta la caracterización de la diversidad y la determinación de su identidad y trazabilidad, todas características indispensables para planificar desarrollos productivos.

En este proyecto, a través de ensayos de cultivo controlados se generará información sobre las características fenotípicas de los clones más utilizados por los usuarios medicinales de nuestra región. El conocimiento sobre la producción de biomasa y metabolitos secundarios como cannabinoides y terpenos resulta indispensable para un uso terapéutico seguro que debe estar disponible para la sociedad.

El conocimiento generado sobre el germoplasma analizado permitirá su descripción, diferenciación y conservación como fuente de germoplasma identificado para fitomejoramiento, registro de nuevas variedades e incorporación en banco de germoplasma nacionales.

En este proyecto se pretende innovar en la generación de herramientas genéticas, en relación a la caracterización de los genotipos de cannabis utilizados en nuestro país. El análisis genómico a través de la tecnología ddRAD-Seq sobre el germoplasma nacional nos permitirá encontrar sitios polimórficos que serán la base para el desarrollo de marcadores moleculares, los cuales nos brindarán información sobre la diversidad y la correlación entre los diferentes recursos de germoplasma. Esto es de utilidad para mantener una adecuada variabilidad genética y avanzar en el mejoramiento de esta planta, según los usos y aplicaciones que se requieran.

A partir de los marcadores moleculares generados se espera poder desarrollar herramientas de identificación de clones y variedades, que nos brinden la identidad y nos permitan tener la trazabilidad de los materiales.

La información generada servirá para crear un banco de datos genéticos amplio de clones y variedades que será de utilidad para clasificar nuevos genotipos y para futuros estudios de asociación con datos fenotípicos, en la búsqueda de marcadores eficientes de selección para sexado temprano, determinación de quimiotipo y para diversos caracteres de interés agronómico, medicinal, alimenticio e industrial.

Cronograma detallado de actividades:

Año 1 / Mes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mantenimiento de madres y multiplicación de esquejes (genotipos 1 a 6)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ensayos de cultivo de tres genotipos (1, 2 y 3) en condiciones controladas	x	x	x	x	x	x	x					
Análisis de producción de biomasa								x	x			
Análisis de rendimiento de resina								x	x			
Identificación y cuantificación de principios activos								x	x	x	x	x
Caracterización morfológica de las variedades	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
Análisis histoquímico de estructuras de la planta								x	x	x	x	x

Obtención de material genético de clones y variedades para análisis genómico por <i>ddRAD-Seq</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Año 2 / Mes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Mantenimiento de madres y multiplicación de esquejes (genotipos 1 a 6)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ensayos de cultivo de tres genotipos (4, 5 y 6) en condiciones controladas	x	x	x	x	x	x	x						
Análisis de producción de biomasa									x	x			
Análisis de rendimiento de resina									x	x			
Identificación y cuantificación de principios activos									x	x	x	x	x
Caracterización morfológica de las variedades	x	x	x	x	x	x	x	x					
Análisis histoquímico de estructuras de la planta									x	x	x	x	x
Análisis genético por microsatélites (genotipos 1 a 6)			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Preparación de muestras para análisis genómico por <i>ddRAD-Seq</i> y envío al servicio de secuenciación	x	x	x	x	x	x							
Análisis bioinformático de <i>ddRAD-Seq</i>								x	x	x	x	x	x
Año 3 / Mes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Mantenimiento de madres y multiplicación de esquejes (genotipos 1 a 6)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Desarrollo y validación de marcadores moleculares	x	x	x	x	x	x	x						
Índices de diversidad, identificación de variantes genéticas, clasificación del germoplasma	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
Selección de marcadores moleculares para									x	x	x	x	x

diferenciación e identificación de clones y variedades												
Estudios de asociación (GWAS), selección de marcadores para selección					x	x	x	x	x	x	x	x

Integrantes del proyecto:

Dra. Silvana L. Colman, UNMdP
 Dra. Julieta Mendieta, CIC-PBA-UNMdP
 Lic. Daniela Villamonte, CONICET-UNMdP
 Lic. Eugenia Voza Berardo, CONICET-UNMdP
 Dra. Cristina Lombardo, CONICET-UNMdP
 Dr. Sebastián D'Ippólito, CONICET-UNMdP
 Lic. Martín Carboni, Museo Argentino de Ciencias Naturales
 Estudiante Marina Landaburu, UNMdP

Lugar propuesto y medidas de seguridad:

El cultivo de las plantas de cannabis y el análisis químico de cannabinoides se realizará en el Instituto de Investigaciones Biológicas UNMdP-CONICET. El análisis morfoanatómico, agronómico y genético (objetivos 2 y 3) se llevarán a cabo en los laboratorios de Botánica y Genética del Depto. de Biología, FCEyN. Los mismos, son lugares de trabajo del Grupo de investigación Biología de Cannabis. El análisis genómico se realizará entre el Laboratorio de genética y el laboratorio de bioinformática del Museo de Ciencias Naturales.

El espacio de cultivo del IIB-UNMdP-CONICET es un contenedor adaptado a cámara de cultivo con triple cerradura, doble puerta de seguridad y alarma. El mismo se encuentra en un predio cerrado con seguridad las 24 horas.

Grupo Biología de Cannabis del Instituto de Investigaciones Biológicas UNMdP-CONICET y Departamento de Biología: Funes 3250 4° nivel, CP 7600 Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Teléfono 223 4753030 (int 13). Correo electrónico de la Secretaría del IIB: iibsecretaria@mdp.edu.ar, Secretaría del Depto. de Biología: dptobiol@mdp.edu.ar.

Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia", Área Bioinformática. Av. Ángel Gallardo 470, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Infraestructura y equipamiento:

El Instituto de Investigaciones Biológicas cuenta con una superficie de aproximadamente 800 m2 organizada en 10 laboratorios y áreas de uso común, como droguero, cuarto de centrifugas, cuartos con temperaturas controladas (18°C, 25°C y 37°C) para crecimiento de plantas y microorganismos, cámara fría, cuarto de cultivo de células (equipado con citómetro de flujo y cámara de cultivo de células), bioterio, invernadero, cuarto de manejo de material radiactivo, cuarto de fotografía, sala de seminarios, biblioteca, taller, lavadero, etc. Incluye las siguientes facilidades:

espectrofotómetros UV-visible, Phosphoimager, microscopios de fluorescencia e invertido, microscopio confocal, lupa, incubadores con agitación, estufas de cultivo de microorganismos, microcentrífugas, centrífugas refrigeradas de alta velocidad, ultracentrífuga, fluoroscan, fotómetro, cámaras de cultivo de plantas, cuarto estéril con flujos laminares, incubadores termostáticos, contador de centelleo, hornos de hibridación, SAVANT, rotavapor, sistema de cromatografía en FPLC y HPLC, freezers de -80° C, sistema integrado de vacío, termocicladores, equipos de PCR en tiempo real, transiluminador, autoclaves, granizadoras, lector de placas de ELISA. Se cuenta también con computadoras con conexión a Internet en cada uno de los laboratorios.

El Laboratorio de Genética de la UNMdP cuenta con microscopios ópticos, lupas, freezers, termociclador, centrífuga, cubas electroforéticas horizontales, balanzas, transiluminador y computadoras. Se cuenta además con el equipamiento del Departamento de Biología: flujo laminar, termociclador, balanzas, destilador, baños termostáticos, centrífugas, heladeras, cámaras de crecimiento y freezer.

El Museo Argentino de Ciencias Naturales, en su área de Bioinformática cuenta con el equipamiento Intel® Core™ i7-8700 CPU @ 3.20GHz, motherboard GIGABYTE Z370 HD3, 64 Gb de RAM, SSD 500 Mb y HDD 2 Tb. Vinculación con server en UIB INTA Balcarce (Intel® Xeon® E5-2640 v4 2,40 GHz) y con el cluster computacional Tupac del Centro de Simulación Computacional para Aplicaciones Tecnológicas (CSC) dependiente del CONICET.

Origen del germoplasma a utilizar:

Se trabajará con variedades de *Cannabis sativa* donadas por la Agrupación Marplatense de Cannabicultores Asociación Civil.

Fuente de financiamiento:

El grupo cuenta con un subsidio de la ANPCyT PICT A 2020- 03535, un Proyecto de Investigación, Extensión y Transferencia de la UNMdP y un Proyecto PIP 112202101 00422CO (2022-2024).



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
1983/2023 - 40 AÑOS DE DEMOCRACIA

Hoja Adicional de Firmas
Informe gráfico

Número:

Referencia: Creacion de documento, peticion desde Expediente Electrónico EX-2023-00547992- -APN-DD#MS

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 12 pagina/s.