

Nuevas fronteras científicas y tecnológicas para el mejoramiento y la producción de cannabis

Lucía Atehortúa

Facultad Ciencias Exactas y Naturales, Instituto de Biología, Sede de Investigación SIU.

Universidad de Antioquia

Medellín, Colombia

Resumen: El gobierno Colombiano con la expedición del Decreto 613 del 2017, en el cual se regula el uso de la marihuana (*Cannabis* sp.) en Colombia con fines medicinales ha abierto un nuevo horizonte para el desarrollo de la investigación sobre esta planta; no solo desde el punto de vista de la producción de fitoterapéuticos, sino también para la generación de nuevas estrategias científicas y técnicas para el mejoramiento y la productividad de esta especie, aprovechando las herramientas biotecnológicas existentes y las emergentes.

En las últimas décadas ha habido una explosión de reportes científicos relacionados con el papel de Cannabis, como fuente de nuevos fitoterapéuticos y esto ha dado origen a la búsqueda de nuevos métodos de producción y mejoramiento genético para incrementar la productividad de los bioactivos de esta especie. Chandra et al, 2013, reportan los trabajos experimentales con Cannabis sativa y papel de la Biotecnología en la propagación y mejoramiento para la producción de los fitocannabinoides. Por otro lado, Schachtsie et al, 2018, documentan y describen las actuales perspectivas para la producción de los Canabinoides en plantas, ilustrando los trabajos que se han realizado a la fecha, aplicando las herramientas biotecnológicas disponibles, además de discutir lo que ha sido exitoso y lo que no ha funcionado para la producción de los bioactivos de esta especie.

Sin embargo, este tipo de investigaciones están en su inicio y todavía no se han explorado en forma amplia diferentes alternativas para la producción de estos bioactivos, tales como la implementación de nuevas herramientas biotecnológicas como las Omicas (genómica, proteómica, metabolómica, transcriptómica, peptidómica, lipidómica entre otras), además de otras tecnologías conexas como la optogenética. Desde otra perspectiva, todavía no se ha explorado ampliamente otras técnicas que han sido útiles en el pasado, para muchas especies medicinales y la producción de sus metabolitos secundarios, entre las cuales vale la pena mencionar los sistemas de micropropagación in vitro y más recientemente el cultivo de Plant Stem Cells (PSCs), la fusión celular, sistemas de elicitación para incrementar los bioactivos, obtención de doble haploides para la producción de plantas únicamente femeninas, procesos de silenciamiento genético para producir plantas enanas o sin tallo que faciliten su cultivo en sistemas hidropónicos, entre otros procesos y técnicas que podrían contribuir a reducir costos y a mejorar la productividad de estas especies, conjuntamente con la aplicación de las técnicas de edición de DNA y aplicaciones en el campo de la optogenética. En el presente documento se exploraran algunas de estas estrategias.

Palabras Clave: Micropropagación, Plant Stem Cells (PSCs), optogenética, haploides, técnicas moleculares

INTRODUCCIÓN

En todo el mundo, el impacto beneficioso de la biotecnología vegetal ha sido casi exclusivamente generado sobre plantas medicinales. Los procesos y técnicas biotecnológicas se han empleado con éxito para la producción a gran escala de fitofármacos, perfumes, colores, sabores y bioplaguicidas.

Los medicamentos de origen vegetal se utilizan en todas las civilizaciones y culturas, y han sido uno de las líneas de trabajo, para mantener la salud y combatir las enfermedades en todo el mundo. Con la creciente demanda de plantas medicinales a nivel mundial para uso en productos farmacéuticos y suplementos dietéticos, la biotecnología surge como una potente herramienta para su conservación y mejora de especies como *Cannabis sativa* la cual posee un arsenal de potentes productos fitoterapéuticos con más 537 moléculas, 101 de las cuales son fitocannabinoides (ElSohley & Slade, 2005), actúan en forma efectiva en algunas dolencias.

Dentro de las técnicas de la Biotecnología, la propagación *in vitro* y las técnicas de transformación genética, desempeñan un papel importante en la multiplicación y potenciación genética de plantas medicinales. Los rápidos avances en la biología molecular e ingeniería genética y la aplicación de las Omicas, tales genómica, proteómica, metabolómica, peptidómica, lipidómica y transcriptómica, conjuntamente ingeniería metabólica y con la reciente tecnología de edición de DNA, constituyen potentes herramientas biotecnológicas para abordar el mejoramiento genético, la calidad y estabilidad genética de los materiales micropropagados, la sobre expresión de genes que codifican para características deseadas, el silenciamiento de genes de caracteres y/o rutas metabólicas indeseadas, además de una serie de tecnologías conexas como la optogenética, abren un nuevo horizonte en el potencial para lograr los productos terapéuticos deseados tanto en calidad como cantidad para hacerle frente a varios problemas de salud global.

La planta de Cannabis tiene una larga historia de uso medicinal en el Medio Oriente y Asia, data del siglo VI aC, mientras que se introdujo en Europa occidental como un medicamento a principios del siglo XIX para tratar algunas dolencias tales como la epilepsia, el tétano, el reumatismo, migraña, asma, neuralgia del trigémino, fatiga e insomnio (Doyle y Spence 1995; Zuardi, 2006). Por esta razón las especies de Cannabis aunque han sido estigmatizadas por su efecto psicoactivo, hoy son apreciadas y reconocidas por sus propiedades medicinales para tratar una variedad de enfermedades, incluido el dolor (Guindon y Hohmann 2009), glaucoma (Jarvinen et al. 2002), náuseas (Slatkin 2007), depresión (Viveros y Marco 2007), y neuralgia (Liang et al. 2004). La especie *C. sativa* contiene una clase única de compuestos terpenofenólicos (los cannabinoides), los cuales se acumula principalmente en los tricomas glandulares de la planta. (Hammond y Mahlberg 1977;). Aproximadamente 110 cannabinoides han sido aislado de la planta, el principal compuesto biológicamente activo es D9 -tetrahidrocannabinol, comúnmente referido como THC (Mechoulam y Ben-Shabat 1999).

Además de su psicoactividad, el THC posee propiedades analgésicas, antiinflamatorias, controladoras del apetito, propiedades estimulantes y antieméticas que hacen de este compuesto un producto muy prometedor como agente terapéutico, especialmente para pacientes con cáncer y SIDA (Sirikantaramas et al. 2005). La potencia farmacológica y terapéutica de los preparados de

Cannabis y su principal componente activo (THC) ha sido ampliamente revisado (Mechoulam 1986; Formukong et al. 1989; Grinspoon y Bakalar 1993; Mattes et al. 1993, 1994; Brenneisen et al. 1996; Pryce y Baker 2005; Abrams et al. 2007).

Debido al alto valor comercial del THC en el área farmacéutica, el costo de producción de THC como el producto farmacéutico activo a granel, se convierte en un importante factor en su desarrollo, lo cual ha llevado al desarrollo de numerosas investigaciones buscando elucidar la síntesis y producción a escala para la industria farmacéutica. Dado que *C. sativa* es una fuente de THC, los esfuerzos para seleccionar las variedades de Cannabis con alto contenido de THC ha sido uno de los blancos de interés de la industria farmacéutica. Sin embargo, debido a la naturaleza alógama (fertilización cruzada) de la especie, es muy difícil de mantener el perfil químico de los quimio-tipos seleccionados en condiciones de campo. Por lo anterior, las herramientas biotecnológicas de micropropagación *in vitro* se constituyen en alternativa para superar estas limitaciones y lograr mantener la identidad genética y el perfil fitoquímico deseado de la planta seleccionada.

Por otro lado, el contenido de fitocannabinoides del *Cannabis* está determinado por la interacción de varios genes, las técnicas de cultivo y factores ambientales (Chandra et al. 2008, 2010a, b; De Meijer et al. 1992, 2003; Hemphill et al. 1980; Mendoza et al. 2009). Numerosos factores bióticos y abióticos afectan la producción de fitocannabinoides, incluyendo el sexo y la madurez de la planta (Small et al. 1976), ciclo de luz (Valle et al. 1978), temperatura (Chandra et al. 2008), fertilización (Bócsa et al. 1997), e intensidad lumínica (Chandra et al. 2008).

Variaciones en el contenido de fitocannabinoides se han reportado en diferentes tejidos específicos como las brácteas florales y más específicamente los tricomas capitados de esta especie (Hemphill et al. 1980). Cada tipo de tejido y célula de la planta, tiene una tarea específica que es impulsada por su propio y único transcriptoma, proteoma y metaboloma. Vale la pena mencionar que estos bioactivos son producidos por esta planta como mecanismo de defensa contra sus patógenos y son almacenados y excretados en sitios específicos (tricomas) de la planta, con el fin de evitar que dichos compuestos se conviertan en sustancias tóxicas para las mismas células de la especie vegetal que los produce.

Recientemente, hemos comenzado a comprender la capacidad de explotar mejor los bioactivos derivados de plantas como resultado de los espectaculares avances en ingeniería metabólica, la aplicación de las omicas, la bioquímica, la caracterización química y molecular, y el tamizaje de productos farmacéuticos. Además, la biotecnología vegetal actúa como una herramienta de investigación central en la investigación básica para aspectos prácticos del mejoramiento vegetal.

1. DISERTACIÓN

1.1. Exposición

Los avances científicos y tecnológicos de hoy, han abierto un abanico de oportunidades para lograr la producción de sustancias y moléculas con propiedades fitoterapéuticas de muchas especies medicinales tales como *Catharanthus roseous*, *Taxus cuspidata*, *Panax ginseng*, entre

otras especies. Dentro de las especies de importancia fitoterapéutica, *Cannabis sativa* se constituye un nuevo blanco para aplicar explora experimentalmente una plétora de herramientas para lograr los productos deseados y en especial el mejoramiento genético que permita obtener altas tasas de productividad de sus bioactivos fitoterapéuticos y la especificidad de los mismos de acuerdo al tipo de dolencia a ser tratada con dichos productos moleculares.

Dentro de las tecnologías convencionales de micropropagación *in vitro*, existen todavía varios nichos por explorar con esta especie, como es la embriogénesis somática para la producción masiva de semilla sintética o artificial, con el fin de superar los problemas existentes en estas plantas por ser de reproducción alógama, lo cual genera altas tasas de variabilidad genética, además con el fin de sustituir la propagación de material vía semilla cigótica o sexual, que a la fecha es costosa y presenta bajas tasas de germinación.

Por otro lado, el cultivo de células para la producción de metabolitos secundarios ha sido un proceso que se ha realizado sin éxito, debido a que dichas células no producen los bioactivos de interés (Raharjo et al., 2005; Florez-Sanchez *et al.*, 2009; Lidoy, 2014) o cuando estos se producen son tóxicos para las células generando muerte celular en dichos cultivos. Debido a lo anterior, otros investigadores han tratado de superar este problema mediante biotransformación, pero con éxitos limitados (Loh et al., 1983; Braemer & Paris, 1987; Pec et al., 2010). Parece que la ausencia de los cannabinoides en cultivos celulares está relacionado con la falta de la actividad de la enzima Polyketide Synthase (Raharjo et al., 2005).

Es importante anotar que la biosíntesis de los cannabinoides son producidos en un tejido específico (tricomas capitados y pedicelados) dependientes del control del desarrollo en este tipo de células especializadas y es quizás que por este hecho, no ha sido factible lograr activar la producción de los metabolitos de Cannabis en otro tipo de células, debido a que su biosíntesis es dependiente del tejido específico donde se encuentran activos todos los mecanismos de control de la producción de los cannabinoides y estos no están activos en otro tipo de células y tejidos desdiferenciados (DDCs), tales como células en suspensión, cultivos de callos y embriones (Florez-Sanchez *et al.*, 2009).

A pesar de que los tricomas son las estructuras especializadas en la producción de los metabolitos de Cannabis (Fig.1), a fecha nadie ha reportado el cultivo de éstos, aunque ya existe una base de datos y una patente sobre promotores de tricomas (EP 2 925869 B1), además de varios reportes sobre tricomas de varias especies (Ma et al., 2015; Hachez,2017; Kumar & Verma, 2017; Balcke et al., 2017), debido a que estos son las verdaderas biofábricas de producción de metabolitos para la defensa contra el ataque de patógenos, (Huchelmann et al.,2017) (TrichOME: A Comparative Omics Database for Plant Trichomes/ Plant Physiol).

Igualmente, a la fecha, nadie ha reportado el cultivo de Células Madres Vegetales o Plant Stem Cells (PSCs) para la producción de los bioactivos de esta especie, aunque en la literatura reciente y emergente, se ha empezado a demostrar que las células madres vegetales (PSCs) son células no diferenciadas con una alta capacidad de multiplicación (casi indefinida por lo que se consideran inmortales), que podrían facilitar su producción a escala y en forma masiva en suspensiones celulares. Por su carácter no diferenciado, estas células presentan características muy valiosas a la hora de cultivarlas en suspensión ya que se ha logrado demostrar que se reduce

ostensiblemente la formación de agregados celulares muy comunes en células des-diferenciadas (DDCs). Otra ventaja es que en estas células es factible expresar los genes que codifican para los metabolitos de interés, lo que implicaría una producción con altas productividades y en forma masiva.

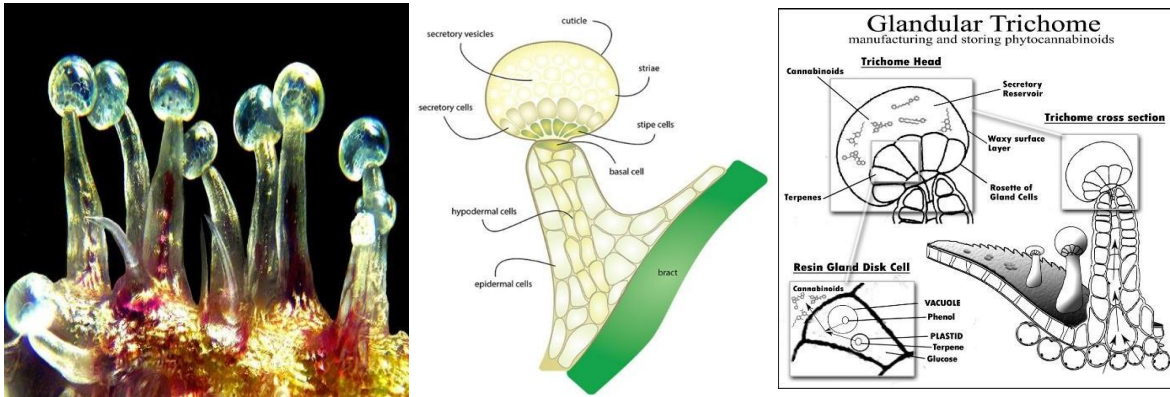
Un ejemplo muy relevante ha sido los estudios previos en *Taxus cuspidata* para producir la droga anticancerígena Paclitaxel. El cultivo de células madre vegetales o PSCs de esta especie ha permitido lograr entre otros beneficios los siguientes: Disminuir el número de agregados celulares en cultivos a nivel de biorreactor; generar una alta productividad de la droga Paclitaxel con un rendimiento del **14.000%**; incrementar la secreción de los metabolitos al medio de cultivo; mejorar los procesos de elicitación celular y mejorar la productividad a nivel de biorreactor. Adicionalmente, las células madres vegetales (PSCs), poseen la capacidad de transformarse en otros tipos de células, que para el caso de Cannabis se podría dirigir su diferenciación hacia la formación de tricomas capitados pedicelados con altos contenidos de los cannabinoides u otras moléculas de interés (Lee et al., 2010; Atehortúa artículo en preparación).

A nivel molecular se pueden realizar estudios de los genes funcionales a través del análisis de transcriptómica, que permitan obtener y expresar genes y las proteínas de interés vía edición de DNA, para la producción de los metabolitos de interés en las células madres vegetales (PSCs), bajo condiciones de fotobiorreactor. Estas técnicas abren otras alternativas novedosas para el estudio de las enzimas y las diferentes rutas metabólicas implicadas en la biosíntesis de los metabolitos secundarios, aprovechando las técnicas de silenciamiento y expresión de genes y mediante la ingeniería metabólica, sería factible modular la producción de moléculas a nivel de los diferentes compartimientos celulares donde estas se producen e interactúan.

Otra de las tecnologías que expanden nuevos horizontes para la producción de moléculas de interés es la optogenética, la cual se basa en la introducción de genes exógenos a nivel celular, que codifican proteínas fotosensibles, las cuales sirven para modificar el comportamiento celular mediante la luz. Nuestro grupo de investigación ha logrado demostrar que los tejidos sometidos a diferentes longitudes de onda de luz LEDs, tienen un efecto específico a nivel celular y es factible lograr la expresión diferencial cualitativa y cuantitativa de proteínas (US Patent 9,408,392 B29), pero también sobre la producción de biomasa celular y otros tipos de metabolitos tanto primarios como secundarios (datos no publicados). En Cannabis vale la pena evaluar el efecto de las diferentes longitudes de onda como un sistema de elicitación sobre la producción de los metabolitos tanto primarios, como secundarios.

Otras técnicas por explorar es la posibilidad de silenciar los genes relacionados con la formación de órganos y tejidos como el caso del tallo. Se podría diseñar molecularmente la probabilidad de obtener plantas sésiles para solo producir aquellas partes de interés como son las brácteas florales en cultivos hidropónicos. Todos estos procesos y aplicaciones de las herramientas tecnológicas existentes y las emergentes, abren un nuevo horizonte para la el desarrollo de nuevas estrategias para la obtención de productos derivados de organismos que contienen productos de interés en todos los sectores de la economía y permitirán ampliar la oferta de nuevos productos mediante procesos de biorefinería para la consolidación de una verdadera Bioeconomía global.

Figura 1: estructura de los tricomas capitados pedicelados de cannabis donde se lleva a cabo la biosíntesis de los metabolitos de interés.



Fuente: Revista Cañamo, web. 2018

CONCLUSIÓN

Basados en los reportes científicos, libros y publicaciones sobre Cannabis, se puede concluir que a pesar de la antigüedad de esta especie y de la cantidad de hibridaciones y mejoras hechas por el ser humano a través del tiempo mediante procesos de cruces convencionales, la verdadera transformación de la industria de *Cannabis sp.*, apenas empieza a desarrollarse, gracias a la Biotecnología y su arsenal de herramientas moleculares, ingeniería metabólica y los más recientes desarrollos de la edición de genes y optogenética, pero además, los nuevos procesos y desarrollos que se darán con la aplicación de los conceptos de biorefinería, para desarrollar ampliamente el nuevo paradigma de la Bioeconomía.

REFERENCIAS

- Abrams et al. 2007. Analysis of cannabinoids in laser-microdissected trichomes of medicinal *Cannabis sativa* using LCMS and Cryogenic NMR. *Phytochemistry*. 87. 51-59.
- Balcke Gerd U., Stefan Bennewitz, Nick Bergau, Benedikt Athmer, Anja Henning, Petra Majovsky, José M. Jiménez-Gómez, Wolfgang Hoehenwarter and Alain Tissier. 2017. Multi-Omics of Tomato Glandular Trichomes Reveals Distinct Features of Central Carbon Metabolism Supporting High Productivity of Specialized Metabolites. *The Plant Cell*, Vol. 29: 960–983
- Bócsa I, Máthé P, Hangyel L (1997). Effect of nitrogen on tetrahydrocannabinol (THC) content in hemp (*C. sativa* L.) leaves at different positions. *J Int Hemp Assoc* 4:80–81
- Braemer R, M. Paris. 1987. Biotransformation of cannabinoids by a cell suspension culture of *Cannabis sativa* L. *Plant Cell Reports* 6(2):150-2 .
- Brenneisen R, Egli A, ElSohly MA, Henn V, Spiess Y (1996). The effect of orally and rectally administered D9-tetrahydrocannabinol on spasticity: a pilot study with 2 patients. *Int J Clin Pharmacol Ther* 34:446–452

- Chandra S, Lata H, Khan IA, ElSohly MA (2008). Photosynthetic response of *C. sativa* L. to variations in photosynthetic photon flux densities, temperature and CO₂ conditions. *Physiol Mol Biol Plants* 14:299–306
- Chandra S, Lata H, Khan IA, ElSohly MA (2010a). Propagation of elite *Cannabis sativa* for the production of D9-Tetrahydrocannabinol (THC) using biotechnological tools. In: Arora R (ed) *Medicinal Plant Biotechnology* (Chapter 7). CABI, Wallingford, pp 98– 114
- Chandra S, Lata H, Mehmedic Z, Khan IA, ElSohly MA (2010b). Assessment of cannabinoids content in micropropagated plants of *Cannabis sativa* L. and their comparison with conventionally propagated plants and mother plant during developmental stages of growth. *Planta Med* 76:743–750
- Christelle M. Andre*, Jean-Francois Hausman and Gea Guerriero. 2016. *Cannabis sativa*: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2016.00019
- De Meijer EPM, Van Der Kamp HJ, Van Eeuwijk FA (1992). Characterization of Cannabis accessions with regard to cannabinoid content in relation to other plant characters. *Euphytica* 62:187–200
- De Meijer EPM, Bagatta M, Carboni A, Crucitti P, Moliterni VMC, Ranalli P, Mandolino G (2003). The inheritance of chemical phenotype in *C. sativa* L. *Genetics* 163:335–346
- Doyle E, Spence AA (1995). Cannabis as a medicine? *British J Anesthesia* 74:359–361
- ElSohly MA, Slade D (2005). Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci* 78:539–548
- Flores-Sanchez IJ, Verpoorte R (2008a). Secondary metabolism in Cannabis. *Phytochem Rev* 7:615–639
- Flores-Sanchez IJ, Verpoorte R (2008b). PKS activities and biosynthesis of cannabinoids and flavonoids in *C. sativa* L. plants. *Plant Cell Physiol* 49:1767–1782
- Formukong EA, Evans AT, Evans F (1989). The medicinal uses of Cannabis and its constituents. *J Phytother Res* 3:219–231
- Grinspoon L, Bakalar JB (1993). *Marihuana, the forbidden medicine*. Yale University Press, New Haven
- Guindon J, Hohmann AG (2009). The endocannabinoid system and pain. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 8:403–421

Hammond CT, Mahlberg PG (1977). Morphogenesis of capitate glandular hairs of *Cannabis sativa* (Cannabaceae). *Amer J Bot* 64:1023–1031

Hemphill JK, Turner JC, Mahlberg PG (1980). Cannabinoid content of individual plant organs from different geographical strains of *C. sativa* L. *J Nat Prod* 43:112–122

Huchelmann Alexandre, Marc Boutry & Charles Hachez. 2017. Plant glandular trichomes: natural cell factories of high biotechnological interest. *Plant Physiology Preview*. DOI:10.1104/pp.17.00727.

Jarvinen T, Pate DW, Laine K (2002). Cannabinoids in the treatment of glaucoma. *Pharmacol Ther* 95:203–220

Julia Schachtsiek, Heribert Warzecha, Oliver Kayser, Felix Stehle. 2018. Current Perspectives on Biotechnological Cannabinoid Production in Plants. *Planta Med* 2018; 84: 214– 220, DOI <https://doi.org/10.1055/s-0043-125087>

Kumar Satish, M.Verma. 2017. TRICHOME: Role of Promoter and *Cis*-Regulatory Elements, and Effect of Gamma Radiation, UV Radiation, Methylation, Phosphorylation. *Int. J. Pure App. Biosci.* **5 (3)**: 284-292

Medicinal Genomics, LLC.[<http://www.medicinalgenomics.com/>].

Lee EK, Jin YW, Park JH, Yoo YM, Hong SM, Amir R, Yan Z, Kwon E, Elfick A, Tomlinson S, Halbritter F, Waibel T, Yun BW, Loake GJ. 2010. Cultured Cambial Meristematic Cells As A Source of Plant Natural Products. *Nat. Biotechnol.* 28(11):1213-7. doi: 10.1038/nbt.1693.

Lidoy Logroño Javier. 2014. In Vitro Cell Culture of *Cannabis Sativa* for the Production of Cannabinoids. Poster Universidad Autónoma de Barcelona. https://ddd.uab.cat/pub/tfg/2014/119249/TFG_javierlidoylogrono.pdf

Loh W.H.-T., S.C. Hartsel, S.L.W. Robertson.1983. Tissue Culture of *Cannabis sativa* L. and *in vitro* Biotransformation of Phenolics. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 111(5): 395-400

Pec, J., Flores-Sanchez, I. J., Choi, Y. H., and Verpoorte, R. (2010). Metabolic analysis of elicited cell suspension cultures of *Cannabis sativa* L. by (1)H-NMR spectroscopy. *Biotechnol. Lett.* 32, 935–941. doi: 10.1007/s10529-010-0225-9

Ma et al., 2015. Ma Dan, Yan Hu1., Changqing Yang, Bingliang Liu, Lei Fang, Qun Wan, Wenhua Liang, Gaofu Mei, Lingjian Wang, Haiping Wan, Linyun Din, Chenguang Dong, Mengqiao Pan, Jiedan Chen, Sen Wang, Shuqi Chen, Caiping Cai, Xiefei Zhu, Xueying Guan, Baoliang Zhou, Shuijin Zhu, Jiawei Wang, Wangzhen Guo, Xiaoya Chen & Tianzhen Zhang. 2016. Genetic basis for glandular trichome formation in Cotton. *Nature Communications* | 7:10456 | DOI: 10.1038/ncomms10456

- Mahlberg, P.G., and Kim, E.S. (2004). Accumulation of cannabinoids in the secretory cavity of *Cannabis*. *J. Industr. Hemp* 9, 15–36. doi: 10.1300/J237v09n01_0
- Mattes RD, Shaw LM, Eding-Owens J, Egelman K, ElSohly MA (1993). Bypassing the first pass effect for therapeutic use of cannabinoids. *Pharmacol Biochem Behav* 44:745–747
- Mattes RD, Egelman K, Shaw LM, ElSohly MA (1994). Cannabinoids appetite stimulation. *Pharmacol Biochem Behav* 44:745–747
- Mechoulam R (1986) The pharmacology history of *Cannabis sativa*. In: Mechoulam R (ed) *Cannabinoids as Therapeutic Agents*. CRC Press, Boca Raton, pp 1–19
- Mendoza M, Mills DE, Lata H, Chandra S, ElSohly MA, Almirall J (2009). Genetic individualization of *C. sativa* by an STR multiplex. *Anal Bioanal Chem* 393:719–726
- Niza Happyana, Sara Agnolet, Remco Muntendam, Annie Van Dam, Bernd Schneider. 2013. Analysis of cannabinoids in laser-microdissected trichomes of medicinal *Cannabis sativa* using LCMS and cryogenic NMR. *Phytochemistry* 87 (2013) 51–59
- Pryce G, Baker D (2005). Emerging properties of cannabinoid medicines in management of multiple sclerosis. *Trends Neurosci* 28:272–276
- Raharjo and Litz. 2005. Plant recovery from SEs and genetically transformed cultures by micrografting. *Acta horticulturae*. DOI: 10.17660/ ActaHortic.2005.692.17
- Schachtsiek Julia, Heribert Warzecha, Oliver Kayser, Felix Stehle. 2018. Current Perspectives on Biotechnological Cannabinoid Production in Plants. *Planta Med* 2018; 84: 214–220.
- Sirikantaramas S, Taura F, Tanaka Y, Ishikawa Y, Morimoto S, Shoyama Y (2005) Tetrahydrocannabinolic acid synthase, the enzyme controlling marijuana psychoactivity is secreted into the storage cavity of the glandular trichomes. *Plant Cell Physiol* 46:1578–1582
- Slatkin NE (2007). Cannabinoids in the treatment of chemotherapy-induced nausea and vomiting: beyond prevention of acute emesis. *J Support Oncol* 5:1–9
- Small E, Jui PY, Lefkovitch LP (1976) A numerical taxonomic analysis of cannabis with special reference to species delimitation. *Syst Bot* 1:67–84
- Tissier A. Trichome specific Expression: Promoters and their Applications. In: Çiftçi YÖ, ed. *Transgenic Plants – Advances and Limitations*. Rijeka, Croatia: In. *TechOpen*; 2012: 353–378
- Valle JR, Vieira JEV, Aucélio JG, Valio IFM (1978). Influence of photoperiodism on cannabinoid content of *C. sativa* L. *Bull Narc* 30:67–68
- Viveros MP, Marco EM (2007). Cannabinoids, anxiety and depression. *Recent Prog Medicinal Plants* 18:225–249

Zuardi AW (2006) History of cannabis as a medicine: a review. *Brazilian J Psychiatry* 28:153–157