

## PLANTAS *CANNABIS* MEJORADAS Y MÉTODOS PARA PRODUCIRLAS Y UTILIZARLAS

### REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reclama prioridad sobre la base del Número de Solicitud Provisional de los Estados Unidos 62/322,736, presentada el 14 de abril de 2016, la cual se incorpora aquí por referencia.

#### ANTECEDENTES

[1] *Cannabis* es un género de planta con flores. Las plantas del género *Cannabis* incluyen tres especies diferentes: *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* y *Cannabis ruderalis*. Las plantas del género *Cannabis* se han utilizado durante mucho tiempo para la fibra de cáñamo, para semillas y aceites de semillas, para fines medicinales y para propiedades psicoactivas.

[2] El *Cannabis* está compuesto de al menos 483 compuestos químicos conocidos, entre ellos se incluyen: cannabinoides, terpenoides, flavonoides, compuestos nitrogenados, aminoácidos, proteínas, glicoproteínas, enzimas, azúcares y compuestos relacionados, hidrocarburos, alcoholes simples, aldehídos, cetonas, ácidos simples, ácidos grasos, ésteres simples, lactonas, esteroides, terpenos, fenoles no cannabinoides, vitaminas, pigmentos y elementos. Estos compuestos se secretan en los tricomas glandulares. Los cannabinoides son exclusivos de la planta de *Cannabis* y ha habido 100 cannabinoides que han sido aislados como moléculas (individuales) purificadas.

[3] La mayoría de los procesos de extracción tienen como objetivo extraer los cannabinoides de las partes florecientes de la planta de *Cannabis*, en particular el tetrahidrocannabinol (THC). El THC tiene muchos efectos, en los que se incluye aliviar el dolor, tratar el glaucoma, aliviar las náuseas e inducir el vómito durante los tratamientos contra el cáncer. Este último, se vende como el medicamento Dronabinol, un isómero puro de THC, (-)-trans- $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol el cual es hecho por el hombre. El nombre de marca en los Estados Unidos es Marinol.

[4] La cromatografía de gases preparativa de extractos de flores ha demostrado ser un método adecuado para proporcionar muestras puras adecuadas de THC, Cannabidiol (CBD) y Cannabinol (CBN). Ha habido dificultades para aislar los cannabinoides puros con el propósito de realizar investigaciones. Los cannabinoides pueden tener efectos sinérgicos o antagónicos entre sí. Otros métodos de extracción incluyen el aceite de hachís (BHO) y la extracción de dióxido de carbono supercrítico. Los cannabinoides se extraen de la planta mediante extracción con solvente (por ejemplo, butano o dióxido de carbono), lo que produce una composición purificada.

[5] Las partes florecientes de la planta de cannabis incluyen tricomas, los cuales comprenden la mayoría de los compuestos secundarios de la planta, por ejemplo, cannabinoides y terpenos.

Los tricomas se pueden separar de la planta colocando toda la planta en un tamiz de malla fina y agitando suavemente para que los tricomas caigan a través de la malla desde la planta. Los tricomas crudos a veces se comprimen en tandas conocidas como hachís o mota.

**[6]** La recolección de compuestos secundarios, por ejemplo, cannabinoides y terpenos de una planta del género *Cannabis* necesita la recolección de tricomas. La recolección de tricomas requiere la floración de una planta del género *Cannabis*. De principio a fin, la recolección de compuestos secundarios de los tricomas de una planta del género *Cannabis* requiere cinco etapas de crecimiento de la planta: germinación; plántula; crecimiento vegetativo; prefloración y la floración.

**[7]** La germinación es la etapa de crecimiento de la planta, durante la cual brotan las semillas y emerge la raíz. En el caso del cannabis, toma de 12 horas a 8 días para que germine una semilla. El calor, la oscuridad y la humedad inician procesos metabólicos como la activación de hormonas que desencadenan la expansión del embrión dentro de la semilla. Luego, la cubierta de la semilla se agrieta y se abre, y una pequeña raíz embrionaria emerge y comienza a crecer hacia abajo. Después de aproximadamente 2 a 4 días, la raíz se ancla y surgen dos hojas embrionarias circulares (también conocidas como cotiledones) en busca de luz, dejando a un lado los restos de la cáscara de la semilla. Esto marca el comienzo de la etapa de la plántula.

**[8]** La germinación puede iniciarse al empapar las semillas entre toallas de papel húmedas, en una taza de agua a temperatura ambiente, en bolitas de turba húmedas o directamente en tierra para macetas. Las bolitas de turba a menudo se utilizan como medio de germinación porque las bolitas saturadas con sus plántulas se pueden plantar directamente en el medio de cultivo previsto con un mínimo de impacto para la planta.

**[9]** La etapa de plántula comienza cuando la cubierta de la semilla se abre y expone la raíz y las "hojas de la semilla" redondas o los cotiledones. La etapa de plántula dura de 1 a 4 semanas y este es el período de mayor vulnerabilidad en el ciclo de vida de la planta, que requiere niveles de humedad moderados, intensidad de luz media a alta y humedad adecuada pero no excesiva del suelo. Una planta de cannabis en crecimiento, comenzará a desarrollar de manera natural características sexuales identificables durante la etapa de plántula, después de 4 a 6 semanas.

**[10]** La planta del género *Cannabis* ingresa a la etapa vegetativa después de que desarrolla siete grupos de hojas verdaderas y la octava es apenas visible en el centro de la punta de crecimiento. Durante la fase vegetativa, la planta dirige sus recursos energéticos principalmente al crecimiento de hojas, tallos y raíces. Se requiere un sistema radical fuerte para el desarrollo floral sano. Como regla general, una planta del género *Cannabis* necesita alrededor de 1 a 2 meses de crecimiento vegetativo antes de comenzar las etapas de prefloración y floración.

[11] La etapa de prefloración, también conocida como "el estiramiento", comienza cuando el fotoperíodo de la planta cambia a 12 o más horas de oscuridad cada 24 horas. La etapa de prefloración puede durar desde un día hasta dos semanas. La mayoría de las plantas pasan de 10 a 14 días en este período después de cambiar el ciclo de luz a 12 horas de oscuridad. Durante la etapa de prefloración, el desarrollo de la planta aumenta drásticamente. La planta puede aumentar de tamaño en un 200 % o más. Durante la etapa de prefloración, la planta desarrolla más ramas y nodos. Las estructuras vegetales requeridas para el desarrollo de la floración. La planta comienza a desarrollar brácteas/bracteolas donde las ramas se encuentran con el tallo (nodos). La pre-floración indica que la planta está lista para florecer.

[12] La etapa de floración varía de aproximadamente 6 a 22 semanas, dependiendo del tipo de planta de cannabis. En general, se cree que las plantas de *Cannabis indica* requieren tiempos de floración más cortos que las plantas de *Cannabis sativa*. Durante la floración, las plantas femeninas no polinizadas producen brotes que contienen glándulas de resina blancas y pegajosas o tricomas. Estos tricomas producen resinas que contienen la mayor cantidad de compuestos secundarios, tales como los cannabinoides, como el THC y el CBN, y los terpenos.

[13] Se ha desarrollado una variedad de técnicas de cultivo para recolectar compuestos secundarios de plantas del género *Cannabis*. Estas técnicas incluyen el cultivo al aire libre, el cultivo en interiores, la hidroponía, la fertilización, la manipulación atmosférica, la clonación, el cruce, SCROG, SOG, el pellizco, el entrenamiento, la poda, etc. Todas las técnicas de cultivo comparten un atributo común: la floración de una planta de género *Cannabis* con el propósito de producir tricomas que comprenden los compuestos secundarios deseados.

[14] Existe la necesidad de una planta del género *Cannabis* que no requiera floración para producir tricomas que contengan compuestos secundarios.

[15] Existe la necesidad de una planta del género *Cannabis* que tenga tricomas en las partes no florecientes de la planta, como por ejemplo, las hojas.

[16] Existe la necesidad de una planta del género *Cannabis* que comprenda un %masa alto de compuestos secundarios.

[17] Existe la necesidad de métodos para producir compuestos secundarios de una planta del género *Cannabis* sin florecer la planta de género *Cannabis*.

[18] Existe la necesidad de métodos para producir compuestos secundarios de una planta del género *Cannabis* sin florecer la planta de género *Cannabis*.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

En el presente documento se revela una planta del género *Cannabis* que no necesita floración para producir tricomas que comprenden compuestos secundarios.

En el presente documento se proporciona una planta del género *Cannabis* que tienen tricomas en partes no florecientes de la planta, tales como las hojas.

**[21]** En el presente documento se divulga una planta del género *Cannabis* que comprende un %masa alto de compuestos secundarios.

En el presente documento también se divulgan métodos para producir compuestos secundarios a partir de una planta del género *Cannabis* sin florecer la planta del género *Cannabis*.

**[23]** En el presente documento se divulgan métodos para inducir el desarrollo de tricomas en una planta del género *Cannabis* sin florecer la planta del género *Cannabis*.

**[24]** En el presente documento se divulga una planta del género *Cannabis*, que tiene un área de superficie que incluye tricomas en las partes no florecientes de la planta. En algunas realizaciones, la planta del género *Cannabis* tiene tricomas en un 25-100 % del área de superficie de la planta. En algunas realizaciones, la planta del género *Cannabis* tiene tricomas en un 50-100 % del área de superficie de la planta. En algunas realizaciones, la planta del género *Cannabis* tiene tricomas en un 70-100 % del área de superficie de la planta.

**[25]** En el contexto de esta divulgación, el "área de superficie de la planta" se refiere a las partes de la planta que se encuentran por encima del nivel del suelo, sin incluir el sistema radical.

**[26]** Como se utiliza en el presente documento, el término "planta" significa un eucariota multicelular del reino *Plantae*, ya sea de origen natural, completamente artificial, o alguna combinación de estos.

**[27]** Como se utiliza en este documento, el término "planta del género *Cannabis*" significa una planta que pertenece al género "*Cannabis*" dentro del sistema taxonómico biológico aceptado, incluyendo las especies *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* y *Cannabis ruderalis*.

**[28]** Como se utiliza en este documento, el término "área de superficie" significa el área total que ocupa la superficie de un objeto. Tal como se utiliza en el presente documento, el "área de superficie" de un objeto se puede calcular en varios grados de precisión o exactitud. En el contexto de esta divulgación, referirse a "tricomas en" un porcentaje expresado" del área de superficie de la planta" se refiere al porcentaje de la superficie exterior de la planta que está ocupada por (o

cubierta con) tricomas.

**[29]** En algunas realizaciones, la planta descrita en el presente documento tiene 20-80 % en masa de compuestos secundarios. En algunas realizaciones, la planta tiene 30-70 % en masa de compuestos secundarios. En algunas realizaciones, la planta tiene 40-65 % en masa de compuestos secundarios. En algunas realizaciones, la planta tiene 30-60 % en masa de compuestos secundarios.

**[30]** Como se utiliza en el presente documento, el término "% en masa de compuestos secundarios" se refiere al porcentaje de la masa total de la planta que está compuesta por compuestos secundarios.

Por ejemplo, una planta que tiene una masa total de 1 kilogramo, que comprende 500 gramos totales de compuestos secundarios, tendría 50 % en masa de compuestos secundarios.

**[31]** En este documento se describe un plásmido que incluye fragmentos de ADNc validados de *Cannabis* nativa correspondientes a la inducción de tricomas.

**[32]** Como se utiliza en el presente documento, el término "plásmido" se refiere a una pequeña molécula de ADN dentro de una célula que está físicamente separada de un ADN cromosómico y puede replicarse independientemente. En un ejemplo, el plásmido es pRI-201AN.

**[33]** En una realización, el término "validado", dentro del contexto del ADNc dentro de un plásmido, significa que la secuencia del ADNc se confirmó mediante una técnica como la digestión con enzimas de restricción y el método de secuenciación de Sanger.

**[34]** Como se utiliza en el presente documento, el término "ADNc" se refiere a ADN complementario el cual es ADN bicatenario sintetizado a partir de una plantilla de ARN mensajero (ARNm) en una reacción normalmente catalizada por la enzima transcriptasa inversa. En el contexto de esta divulgación, el término "ADNc" puede referirse al ADNc natural, modificado o sintético o combinaciones de los mismos en cualquier proporción.

**[35]** Como se utiliza en el presente documento, el término "inducción de tricomas" significa causar el desarrollo de tricomas. En el contexto de esta descripción, el término "inducción de tricomas" puede referirse a la promoción de procesos biológicos para la fabricación o el crecimiento de tricomas. El término "inducción de tricomas" también puede referirse a frustrar o obstruir los procesos biológicos que disminuyen la producción de tricomas, como el interferir con un represor de desarrollo de tricomas.

**[36]** En este documento se revela una bacteria transformada purificada que comprende ADN

de cannabis nativa. En una realización, el ADN de cannabis nativa corresponde a la inducción de tricomas en una planta de Cannabis nativa.

[37] Como se utiliza en el presente documento, el término "bacterias transformadas" se refiere a una bacteria alterada genéticamente que resulta de la captación e incorporación de material genético exógeno, por ejemplo, el ADN. En el contexto de esta divulgación, el término "bacterias transformadas purificadas" se refiere a bacterias transformadas, que han sido aisladas de su entorno natural. Por ejemplo, una bacteria puede recogerse de un medio de cultivo por centrifugación. En algunas realizaciones, las bacterias transformadas purificadas se suspenden en un tampón.

[38] Como se utiliza en el presente documento, el término "ADN de cannabis nativa" significa el ADN encontrado dentro de una planta de origen natural del género *Cannabis*. En el presente documento se divulga una bacteria *Agrobacterium tumefaciens* modificada genéticamente, que comprende ADN de cannabis nativa correspondiente a la inducción de tricomas en una planta de cannabis nativa.

[39] En algunas realizaciones, una planta del género *Cannabis* tiene fragmentos de ADNc

correspondientes a la inducción de tricomas en una planta que no es del género *Cannabis*.

[40] Como se utiliza en el presente documento, el término "planta que no es del género *Cannabis*" significa una planta que no pertenece al género "*Cannabis*" dentro del sistema taxonómico biológico aceptado. Por ejemplo, una "planta que no es del género *Cannabis*" incluye una planta del género *Arabidopsis*. Pero, una "planta que no sea del género *Cannabis*" no incluye una planta seleccionada entre la *Cannabis sativa*, la *Cannabis indica* y la *Cannabis ruderalis*.

[41] En el presente documento se divulgan métodos de producción de compuestos secundarios en una planta del género *Cannabis* que comprende inducir el desarrollo de tricomas en una planta del género *Cannabis*. En algunas realizaciones, los compuestos secundarios se seleccionan de cannabinoides o terpenos.

[42] Como se utiliza en el presente documento, el término "terpeno" significa un compuesto orgánico construido en un andamiaje estructural isoprenoide o producido mediante la combinación de unidades de isopreno. A menudo, las moléculas de terpeno que se encuentran en las plantas pueden producir olor.

[43] La estructura de los terpenos están construidas con unidades de isopreno, las cuales son estructuras de 5 carbonos. Los flavonoides generalmente se consideran estructuras de 15

carbonos con dos anillos de fenilo y un anillo heterocíclico. Por lo tanto, podría haber una superposición en la que un flavonoide podría considerarse como un terpeno. Sin embargo, no todos los terpenos podrían considerarse flavonoides.

**[44]** En el contexto de esta divulgación, el término terpeno incluye hemiterpenos, monoterpenos, ésteres terpénicos, diterpenos, monoterpenos, politerpenos, tetraterpenos, óxidos terpenoides, sesterterpenos, sesquiterpenos, norisoprenoides o sus derivados.

**[45]** Los derivados de los terpenos incluyen terpenoides en sus formas de hemiterpenoides, monoterpenoides, sesquiterpenoides, sesterterpenoides, sesquiterpenoides, tetraterpenoides, triterpenoides, tetraterpenoides, politerpenoides, isoprenoides y esteroides. Pueden ser formas:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\text{o}\chi\text{o}$  -, isómeros, o sus combinaciones.

**[46]** Entre los ejemplos de terpenos dentro del contexto de esta divulgación se incluyen: 7,8-dihidroionona, acetanisol, ácido acético, acetil cedreno, anetol, anisol, benzaldehído, bergamoteno ( $\alpha$ -cis-bergamoteno) ( $\alpha$ -trans-bergamoteno), bisabolol ( $\beta$ -bisabolol), borneol, acetato de bornilo, ácido butanoico/butírico, cadineno ( $\alpha$ -cadineno) ( $\gamma$ -cadineno), cafestol, ácido cafeico, camfeno, alcanfor, capsaicina, carene ( $\Delta$ -3-carene), caroteno, carvacrol, carvona, dextro-carvona, laevo-carvona, cariofileno ( $\beta$ -cariofileno), óxido de cariofileno, castóreo absoluto, cedreno ( $\alpha$ -cedreno) ( $\beta$ -cedreno), epóxido de cedreno (acedreno epóxido), cedrol, cembreno, ácido clorogénico, cinamalaldehído ( $\alpha$ -amil-cinamalaldehído) ( $\alpha$ -hexil-cinamalaldehído), ácido cinnámico, alcohol cinámico, cintronelal, citrionelol, criptone, curcumeno, ( $\alpha$ -curcumeno), ( $\gamma$ -curcumeno), decanal, dehidrovomifoliol, disulfuro de dialilo, dihidroactinidiolide, disulfuro de dimetilo, eicosano/lcosano, elemene ( $\beta$ -elemene), estragol, acetato de etilo, cinamato de etilo, etil maltol, eucaliptol/1,8-cineol, eudesmol ( $\alpha$ -eudesmol) ( $\beta$ -eudesmol) ( $\gamma$ -eudesmol), eugenol, eufol, farneseno, farnesol, fenchol ( $\beta$ -fenchol), fenchon, geraniol, acetato de geraniol, germacrenos, germacreno B, guaia-1 (10), 11-dieno, guaiacol, guaieno ( $\alpha$ -guaieno), gurjunene ( $\alpha$ -gurjunene), herniarina, hexanalaldehído, ácido hexanoico, humulene ( $\alpha$ -humulene) ( $\beta$ -humulene), lonol (3-oxo- $\alpha$ -ionol) ( $\beta$ -lonol), lonone ( $\alpha$ -lonone) ( $\beta$ -lonone), ipsdienol, acetato de isoamilo, alcohol isoamilo, formiato de isoamilo, isoborneol, isomircenol, isopulegol, ácido isovalérico, isopreno, kahweol, lavandulol, limoneno, ácido  $\gamma$ -linolénico, linalol, longifoleno,  $\alpha$ -longipineno, licopeno, mentol, butirato de metilo, 3-mercapto-2-metilpentanal, mercaptano/tioles,  $\beta$ -mercaptoetanol, ácido mercapto acético, alil mercaptano, bencilo mercaptano, butil mercaptano, etil mercaptano, metil mercaptano, furfuril mercaptano, etileno mercaptano, propil mercaptano, thenil mercaptano, metil salicilato, metilbutenol, metil-2-metilvalorato, metil tiobutirato, mirceno ( $\beta$ -mirceno),  $\gamma$ -muurolene, nepetalactona, nerol, nerolidol, acetato de nerilo, nonanalaldehído, ácido nonanoico, ocimeno, octanal, ácido octanoico, p-cimeno, pentilo butirato, felandreno, fenilacetalaldehído, feniletanetiol, ácido fenilacético, fitol, pineno,  $\beta$ -pineno, propanetiol, pristimerin, pulegona, quercetina, retinol, rutin, sabinena, hidrato

de sabienina, cis-hidrato de sabienina, trans-hidrato de sabienina, safranal,  $\alpha$ -selineno,  $\alpha$ -sinensal,  $\beta$ -sinensal,  $\beta$ -sitosterol, escualeno, taxadieno, hidrato de terpin, terpineol, terpin-4-ol,  $\alpha$ -terpineno, y terpineno, terpinoleno, tiofenol, tujona, timol,  $\alpha$ -tocoferol, tonka undecanona, undecanal, valeraldehído/pentanal, verdoxan, y  $\alpha$ -umbeliferona, o vanilina.

**[47]** Como se utiliza en el presente documento, el término "cannabinoides" significa cualquier sustancia que actúa sobre un receptor de cannabinoides. Por ejemplo, el término cannabinoides incluye ligandos cannabinoides tales como los agonistas, los agonistas parciales, agonistas inversos o antagonistas, como lo demuestran los estudios de unión y los ensayos funcionales. En muchos ejemplos, un cannabinoides se puede identificar porque su nombre químico incluirá la cadena de texto "\*cannabi\*" en el nombre. En el contexto de esta aplicación, donde se hace referencia a un cannabinoides en particular, cada uno de los ácidos y/o formas descarboxiladas se contemplan como moléculas y mezclas individuales.

**[48]** Entre los ejemplos de cannabinoides en el contexto de esta divulgación se incluyen compuestos que pertenecen a cualquiera de las siguientes clases de moléculas, sus derivados, sales o análogos: tetrahidrocannabinol (thc), tetrahidrocannabinol (thcv), cannabidrol (cbd), cannabichromanon (cbcn), cannabidiol (cbd), cannabielsoina (cbe), cannabidivarin (cbdv), cannabifurano (cbf), cannabigerol (cbg), cannabicitrol (cbl), cannabinol (cbn), cannabindiol (cbnd), cannabitriol (cbl), cannabivarin (cbv) e isocannabinoides.

**[49]** En este documento se divulga un método de recolección de al menos un cannabinoides o al menos un terpeno durante el ciclo de crecimiento vegetativo de la planta del género *Cannabis*.

**[50]** Como se utiliza en el presente documento, la frase "recolección"... durante el ciclo de crecimiento vegetativo" significa recolectar compuestos secundarios mientras la planta se encuentra en la etapa vegetativa de crecimiento en lugar de esperar hasta que la planta florezca.

**[51]** En algunas realizaciones, el método de recolección de al menos un cannabinoides o al menos un terpeno durante el ciclo de crecimiento vegetativo de la planta del género *Cannabis* incluye la modificación del material genético de la planta del género *Cannabis*.

**[52]** En una realización, "la modificación del material genético de la planta del género *Cannabis*" se incluye la sobreexpresión independiente de uno o más genes individuales que inducen el desarrollo de tricomas. En una realización, uno o más genes se seleccionan de la literatura disponible y se aíslan del pariente más cercano con datos de secuencia publicados. El ADN aislado se insertó en un casete de expresión. La sobreexpresión del ARNm se logró a través

de una secuencia del promotor CaMV 35S. La expresión robusta de proteínas se realizó con secuencias AtADH 5' UTR y HSP 3' UTR. Este casete de expresión se insertó en el genoma de interés de la planta de cannabis utilizando un vector binario *Agrobacterium* mediado por el sistema. La transgénesis a pequeña escala se logró a escala local con infiltración de jeringa y en toda la planta mediante infiltración al vacío.

**[53]** En una realización, "material genético modificador de la planta del género *Cannabis*" incluye la expresión del gen de interés. En una realización, la expresión del gen diana comprende una represión de la expresión de al menos un gen de patrón/inducción de tricomas. En una realización, uno o más genes se seleccionan de la literatura disponible y se aíslan del pariente más cercano con datos de secuencia publicados.

**[54]** En algunas realizaciones, el método de recolección de al menos un cannabinoide o al menos un terpeno durante el ciclo de crecimiento vegetativo de la planta del género *Cannabis* incluye la modificación del material genético de la planta del género *Cannabis*.

**[55]** En algunas realizaciones, el método de recolección de al menos un cannabinoide o al menos un terpeno durante el ciclo de crecimiento vegetativo de la planta del género *Cannabis* incluye la modificación del material genético de la planta del género *Cannabis*.

**[56]** En algunas realizaciones, el método de recolección de al menos un cannabinoide o al menos un terpeno durante el ciclo de crecimiento vegetativo de la planta del género *Cannabis* incluye la sobreexpresión de al menos un gen de inducción de tricomas. En algunas realizaciones, al menos un gen de inducción de tricomas se selecciona de las familias bHLH, repeticiones WD40, R2R3-MYB o R3-MYB.

**[57]** En algunas realizaciones, el método de recolección de al menos un cannabinoide o al menos un terpeno durante el ciclo de crecimiento vegetativo de la planta del género *Cannabis* incluye infectar células de la planta del género *Cannabis* con una bacteria transformada. En algunas realizaciones, el método incluye infectar células de la planta del género *Cannabis* con una bacteria transformada mediante infiltración de jeringa. En algunas realizaciones, el método incluye infectar células de la planta del género *Cannabis* con una bacteria transformada mediante infiltración de jeringa.

**[58]** En una realización, la "infiltración de la jeringa" se realizó de la siguiente manera: jeringa de 10 ml o 50 ml sin aguja y cargada con una solución de bacterias. La punta de la jeringa se colocó de forma plana contra la parte inferior de la hoja. Utilizando un guante, se colocó un dedo contra la parte superior de la hoja para aplicar presión. El émbolo se presionó ligeramente, permitiendo que el líquido se desplazara a través de los estomas abiertos hacia el espacio intercelular en la hoja, donde las bacterias pueden infectar las células y posteriormente insertar nuestro casete de expresión con el gen de interés. Este procedimiento se llevó a cabo cuando las plantas estaban

bajo luz brillante para asegurar la transpiración activa y los estomas abiertos. Las plantas se cultivaron y se les evaluó la expresión en el sitio de inyección. Se observó transgénesis localizada.

**[59]** En una realización, la "infiltración por vacío" se realizó de la siguiente manera: Clones pequeños con raíces fueron suspendidos boca abajo en un baño de solución de bacterias; todas las hojas, tallos y puntas de crecimiento se sumergieron y las raíces se dejaron expuestas; el baño se colocó en una cámara de vacío y se aplicó un vacío a las raíces, llevando así la solución a las hojas a través de los estomas abiertos y el resto de la planta a través del sistema vascular. Este procedimiento dio como resultado la expresión de mosaico del transgén en toda la planta. La planta se cultivó y se subclonó utilizando clonación de plantas tradicional y/o cultivo de tejidos vegetales. En una realización, la etapa de subclonaje comprende utilizar un antibiótico. El clon fue utilizable en un escenario de cultivo de cannabis normal, mientras expresaba el transgén y su fenotipo resultante.

**[60]** En algunas realizaciones, el método de recolección de al menos un cannabinoide o al menos un terpeno durante el ciclo de crecimiento vegetativo de la planta del género *Cannabis* incluye el tratamiento de células de plantas del género Cannabis con ADN unido a una partícula de metal a través del sistema de biolística.

**[61]** En algunas realizaciones, el método de recolección de al menos un cannabinoide o al menos un terpeno, durante el ciclo de crecimiento vegetativo de la planta del género *Cannabis*, incluye la represión del procesamiento postranscripcional de un represor transcripcional de la inducción de tricomas y/o la represión de la expresión de un gen de interés como una proteína funcional.

**[62]** En algunas realizaciones, el método de recolección de al menos un cannabinoide o al menos un terpeno durante el ciclo de crecimiento vegetativo de la planta del género *Cannabis* incluye la expresión de una molécula de ARN interferente correspondiente a un gen de represión de inducción de tricomas y/o reducción de la traducción de los genes de represión de inducción de tricomas del ARNm a proteínas funcionales.

**[63]** En algunas realizaciones, el método de recolección de al menos un cannabinoide o al menos un terpeno durante el ciclo de crecimiento vegetativo de la planta del género Cannabis incluye modificar la expresión de TALLOS DE INFLORESCENCIA GLABRO (GIS), TALLOS DE INFLORESCENCIA GLABRO 2 (GIS2) TALLOS DE INFLORESCENCIA GLABRO 3, (GIS3) TRICOMA DE COTILEDON 1 (COT1), MYB5, ARPC5, YB106, FZR2, HOMEODOMINIO GLABRO 12 (HDG12) TRICOMAS SIN RAMAS (BTL), HOMEODOMINIO GLABRO 11 (HDG11), STICHEL (STI), RAMA TRICOMA IRREGULAR 1 (ITB1), CACTUS (KAK), MIOSINA XI K, ATXIK, PROTEÍNA RELACIONADA CON DINAMINA (DRP1A), ATRLCK VI\_A3, ZWICHEL, FRC1, FRC3, FRC4, ITB2, ITB3, ITB4, RASTIFARI (RFI), STA, SUZ1, SUZ2, SUZ3, PROTEÍNA DEDOS DE CINC 5, PROTEÍNA DEDOS DE CINC 6, PROTEÍNA

DEDOS DE CINC 8, MODULADOR EXPRESIÓN GL 2(GEM), ARLEQUÍN (HQL), TESTA TRANSPARENTE 8 (TT8) en una planta de género *Cannabis*.

**[64]** En algunas realizaciones, el método de recolección de al menos un cannabinoide o al menos un terpeno durante el ciclo de crecimiento vegetativo de la planta del género *Cannabis* incluye la modificación de la expresión de un gen seleccionado de las familias de genes R2R3-MYB, bHLH, repeticiones WD40 o R3-MYB.

**[65]** En algunas realizaciones, el método de recolección de al menos un cannabinoide o al menos un terpeno durante el ciclo de crecimiento vegetativo de la planta del género *Cannabis* incluye la modificación del material genético de la planta del género *Cannabis*.

#### **EJEMPLOS:**

**[66]** A continuación se presentan varios ejemplos proporcionados dirigidos a ilustrar realizaciones específicas de esta divulgación. Estos ejemplos son ilustrativos y no pretenden limitar el amplio alcance de la divulgación.

##### **Ejemplo 1: Ilustración de la creación de ADNc**

**[67]** Las semillas de *Arabidopsis thaliana* (genotipo: Col-1) se germinaron y se cultivaron durante 48 y 72 horas saturadas en diH<sub>2</sub>O a temperatura ambiente. Las semillas germinadas se recolectaron en tubos de microcentrífuga y se congelaron inmediatamente a -80 grados centígrados para el almacenamiento previo a la extracción de ácidos nucleicos. Tanto las muestras de 48 horas como las de 72 horas se agruparon y su ARN se extrajo utilizando un kit y protocolo comercial estándar (Qiagen, RNeasy Plant Mini Kit).

##### **Ejemplo 2: Creación de la genoteca de ADNc**

**[68]** El extracto de ARN total descrito en el Ejemplo 1 se utilizó como plantilla para la creación de una genoteca de ADNc a través de la transcripción inversa. La reacción se realizó con una transcriptasa inversa (Superscript IV) y cebado utilizando oligos hexaméricos aleatorios.

##### **Ejemplo 3: Ensamblaje de constructo de ADN y cultivo bacteriano**

**[69]** Para expresar el gen de interés EGL3 de la *Arabidopsis thaliana* (AtEGL3) en cannabis, se utilizó un constructo ubicuo de sobreexpresión de proteínas.

**[70]** Primero, los cebadores específicos para amplificar la secuencia completa de ARNm para el gen AtEGL3 fueron diseñados con base en la información de secuencia disponible. El gen de

interés se amplificó utilizando la reacción en cadena de la polimerasa.

#### **Ejemplo 4:** Generación de transformantes de una sola colonia

[71] El producto descrito en el Ejemplo 3 se secuenció, se verificó y se utilizó con el plásmido vector. El plásmido vector contiene una secuencia del promotor vegetal CaMV 35S, una secuencia UTR 5' del gen de la deshidrogenasa de alcohol de la *Arabidopsis thaliana* y una secuencia UTR 3' de un gen de la proteína de choque térmico de *Arabidopsis thaliana*. El gen AtEGL3 se ligó en el plásmido vector entre las UTR descritas anteriormente y dentro del marco con el sitio de inicio de la transcripción presente en AtADH 5' UTR.

[72] El plásmido descrito anteriormente fue clonado luego en células competentes de *E. coli*. Las colonias individuales se seleccionaron para un plásmido correctamente ensamblado. Una muestra del plásmido de la colonia seleccionada se purificó y posteriormente se transformó en *Agrobacterium tumefaciens*. Las colonias individuales de estos transformantes de *Agrobacterium* se cultivaron en un cultivo líquido pequeño y se utilizaron para hacer balas celulares congeladas para su uso posterior en plantas.

#### **Ejemplo 5:** Inoculación de *Agrobacterium*

[73] Se realizaron múltiples iteraciones idénticas del siguiente protocolo en paralelo para probar diferentes cepas transformadas de *Agrobacterium* de la descripción anterior. Esta descripción a continuación rastrea una de estas réplicas de ejemplo.

[74] Se utilizó un raspado de una bala celular de *Agrobacterium* transformada, descrita en el Ejemplo 4, para inocular una placa de medios de cultivo y luego se incubó. Se utilizó una sola colonia de esta planta para inocular un cultivo líquido grande (0,1 - 1L). Este cultivo se incubó mediante agitación hasta que el crecimiento alcanzó el nivel de registro. Las células se recolectaron posteriormente mediante centrifugación y se suspendieron nuevamente en medios de infiltración suplementados con MES y *Acetosyringona*.

#### **Ejemplo 6:** Transformación de la planta

[75] Escala local: La solución de inoculación en plantas descrita en el Ejemplo 5 se inyectó en la hoja intercalada de las hojas de abanico de las plantas de cannabis en crecimiento. Esto se logró con una jeringa de 25 ml de ancho. Se le dio la vuelta a la hoja de abanico y se aplicó presión a la superficie superior directamente opuesta a la punta del cilindro de la jeringa en la parte inferior de la hoja. Al aplicar una presión ligera, se inyectó fluido de inoculación en un área de la hoja que medía aproximadamente 2 pulgadas por 2 pulgadas. Todas las hojas se marcaron y se puntuaron una semana después para la producción de tricomas en el sitio de inyección. Las plantas se

mantuvieron en condiciones normales de cultivo intensivo durante todo el proceso.

#### **Ejemplo 7: Producción y análisis de toda la planta**

**[76]** La solución de inoculación descrita anteriormente se colocó en un vaso de precipitado y una pequeña planta de cannabis se suspendió y se colocó de forma inversa en la solución con las raíces por encima del nivel del líquido. Esta configuración resultante se colocó luego en una cámara de vacío y se expuso a una corta duración de presión reducida, de este modo la solución se introdujo en la planta. Después de este tratamiento, la planta se cultivó en condiciones normales durante 2 semanas. Posteriormente, se tomaron los recortes de esta planta tratada y se cultivaron. Las plantas cultivadas a partir de estos esquejes se evaluaron para la producción de tricomas durante todo el crecimiento.

#### **Ejemplo 8: Observación de la expresión de un gen de bHLH, AtEGL3 en Cannabis**

**[77]** Escala local: La mayoría de los sitios de inyección en las hojas de abanico de plantas sobreexpresadas mostraron alguna formación de tricomas, mientras que las hojas de abanico de plantas naturales mostraron solo una cantidad insignificante de tricomas.

**[78]** Se observó crecer el fenotipo de los tricomas ectópicos desde el lugar de la inyección, y cerca del tejido de la hoja circundante era clara y visiblemente evidente. El análisis de las imágenes digitales tomadas de las hojas de abanico para la densidad del tricoma que rodea el sitio de inyección mostró un aumento en la densidad del tricoma: un promedio de 8,4 veces el número de tricomas cerca del sitio de inyección en comparación con un limbo no inyectado de la misma hoja.

#### **Ejemplo 9: Plantas completas**

**[79]** Las plantas elaboradas con el método descrito anteriormente se cultivaron y florecieron siguiendo los métodos estándar de cultivo de cannabis. Tanto las plantas no modificadas de la misma madre como aquellas modificadas, también se cultivaron en el mismo entorno. La producción de THC de estas plantas se midió al final del ciclo de floración.

**[80]** Los resultados para la producción de THC de las flores analizadas dentro de esta población demostraron una variabilidad significativa entre las plantas modificadas y las no modificadas. Las hojas de abanico en las plantas modificadas mostraron un fenotipo variable con algunas cubiertas en los tricomas y otras no. De las que estaban cubiertas con tricomas, su contenido de THC fue del 10,6 % en comparación con las plantas cultivadas naturalmente (no sometidas a un protocolo de sobreexpresión), las cuales se midieron para tener un contenido de THC inferior al 1 %. Las plantas modificadas mostraron tricomas antes que los comparadores no modificados durante el crecimiento. Las plantas modificadas produjeron significativamente más pigmentación púrpura

que las plantas no modificadas.

**[81]** Aunque la presente invención en el presente documento se ha descrito con referencia a diversas realizaciones de ejemplo, se debe entender que estas realizaciones son simplemente ilustrativas de los principios y aplicaciones de la presente invención. Los expertos en la técnica reconocerían que podrían realizarse diversas modificaciones a las realizaciones de ejemplo, sin apartarse del alcance de la invención.

**[82]** Además, debe entenderse que varias características de distintas realizaciones en el presente documento pueden combinarse entre sí. Por lo que debe entenderse que se pueden realizar numerosas modificaciones a las realizaciones ilustrativas y que pueden concebirse otras disposiciones sin apartarse del alcance de la invención.

**[83]** Además, otras realizaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la consideración de la descripción y la práctica de la invención descrita en el presente documento. Se pretende que la descripción y los ejemplos se consideren únicamente a modo de ejemplo, con un alcance y espíritu que se indican en las reivindicaciones.

**[84]** Finalmente, se observa que, tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen referencias plurales a menos que estén limitadas de forma expresa e inequívoca a un referente, y viceversa. Tal como se usa en el presente documento, el término "incluye" o "que comprende" y sus variantes gramaticales no pretenden ser limitativas, de modo que la recitación de un artículo o artículos no excluye otros artículos similares que pueden ser sustituidos o agregados al artículo(s) recitado(s).