

PLANTAS Y MÉTODOS PARA AUMENTAR Y DISMINUIR LA SÍNTESIS DE CANNABINOIDES

MEMORIA DESCRIPTIVA

REFERENCIA CRUZADA A OTRAS APLICACIONES RELACIONADAS

Esta solicitud reclama prioridad a la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Número de serie 62/376.521 presentada el 18 de agosto de 2016, Solicitud Provisional de los Estados Unidos Número de serie 62/385.102 presentada el 8 de septiembre de 2016, Solicitud Provisional de los Estados Unidos Número de serie 62/416.084 presentada el 1 de noviembre de 2016, Solicitud Provisional de Estados Unidos Número de serie 62/416.098 presentada el 1 de noviembre de 2016, Solicitud Provisional de Estados Unidos Número de serie 62/429.039 presentada el 1 de diciembre de 2016, Solicitud Provisional de Estados Unidos Número de serie 62/429.046 presentada el 1 de diciembre de 2016 y la Solicitud Provisional de Estados Unidos, Número de serie 62/429.049 presentada el 1 de diciembre de 2016, cada una de las cuales se incorpora a la presente por referencia.

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se ha enviado electrónicamente en formato ASCII y se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 22 de septiembre de 2017, tiene por nombre 10064-0012-304_SL.txt y tiene un tamaño de 2.644 bytes.

CAMPO TÉCNICO

Esta divulgación se refiere a la industria del cannabis. En particular, esta divulgación se refiere a plantas nuevas, hechas por el hombre, del género cannabis.

ANTECEDENTES

La palabra "cannabis" se refiere a un género de plantas con flores. Las plantas del género cannabis incluyen varias especies, entre ellas Cannabis sativa, Cannabis indica, y Cannabis ruderalis. Existe una larga historia en el cultivo de plantas del género cannabis para fibras de cáñamo, semillas y aceites de semillas, fines medicinales y actividades recreativas.

Según algunas versiones, el cannabis está compuesto de al menos 483 compuestos químicos conocidos, que incluyen cannabinoides, terpenoides, flavonoides, compuestos nitrogenados, aminoácidos, proteínas, glicoproteínas, enzimas, azúcares y compuestos relacionados, hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos, ácidos grasos, ésteres,

lactonas, esteroides, terpenos, fenoles no cannabinoides, vitaminas, y pigmentos.

Los cannabinoides son de particular interés para la investigación y comercialización.

Por lo general, los cannabinoides se extraen de la planta de cannabis como parte de una mezcla cruda, combinada con otros compuestos químicos que se encuentran en la planta de cannabis. La mayoría de las extracciones de materia vegetal de cannabis tienen como objetivo extraer cannabinoides, particularmente tetrahidrocannabinol (THC). El THC es útil para aliviar el dolor, tratar el glaucoma y aliviar las náuseas. El THC también está ganando inmensa popularidad como una droga recreativa. Otros cannabinoides de interés incluyen, Cannabigerol (CBG), Ácido Cannabigerólico (CBGA), Cannabidiol (CBD), Cannabinol (CBN), Cannabicromeno (CBC), Tetrahidrocannabivarina (THCV), Cannabigerovarina (CBGV), y Ácido Cannabigerovarínico (CBGVA).

Se han desarrollado una variedad de técnicas de crecimiento y cultivo para aumentar la producción de compuestos secundarios dentro de las 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 cruzamiento, la Pantalla de cultivo (SCROG), el Mar verde (SOG), el “pinching”, el entrenamiento, el “topping”, etc.

Si bien las técnicas de reproducción y cultivo producen plantas con altas concentraciones de cannabinoides, estas técnicas no proporcionan el nivel de control y producción necesarios. La investigación de cannabinoides es todavía nueva y tener plantas que produzcan ciertos cannabinoides sería ventajoso para la investigación y el desarrollo. Además, separar cientos de moléculas puede resultar difícil y consumir mucho tiempo, incluso para los químicos con experiencia.

Existe la necesidad de una planta del género cannabis que produzca cantidades particulares de cannabinoides, más alta en algunos casos y más baja en otros. En particular, las plantas del género cannabis producen selectivamente ciertos cannabinoides sobre otros. También existe una necesidad de plantas de género cannabis que produzcan proporciones y/o concentraciones de cannabinoides que no ocurren naturalmente. También existe la necesidad de manipular las vías biosintéticas de una planta del género cannabis.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En este documento se describen nuevas plantas de género cannabis. En una realización, la planta del género cannabis produce proporciones y/o concentraciones de cannabinoides que ocurren de forma no natural. En una realización, la planta del género cannabis produce preferentemente un primer cannabinoide en una cantidad mayor que un segundo cannabinoide. En una realización, la planta del género cannabis produce preferentemente un primer

cannabinoide en una cantidad menor que un segundo cannabinoide. En una realización, la planta del género cannabis es hecha por el hombre.

En este documento se describe un nuevo método para producir una planta del género cannabis. En una realización, el método descrito en el presente documento comprende controlar la ruta biosintética de uno o más cannabinoides. En una realización, el método descrito en el presente documento comprende manipular la expresión de una o más enzimas de síntesis de cannabinoides.

En el presente documento se describe una nueva planta del género cannabis, que comprende:

un contenido total de cannabinoides;

un primer cannabinoide que comprende más del 10% del contenido total de cannabinoides en peso seco;

un segundo cannabinoide que comprende menos del 10% del contenido total de cannabinoides en peso seco; y

material genético modificado dentro de un genoma de la planta del género cannabis.

En una realización, el primer cannabinoide se elige entre Ácido cannabigerólico (CBGA), Monometiléter de ácido cannabigerólico (CBGAM), Cannabigerol (CBG), Monometiléter de cannabigerol (CBGM), Ácido Cannabigerovarínico (CBGY), Cannabigerovarina (CBGV), Ácido cannabicroménico (CBCA), Cannabicromeno (CBC), Ácido Cannabicromevarínico (CBCVA), Cannabicromevarina (CBCV), Ácido Cannabidiólico (CBDA), Cannabidiol (CBD), Cannabidiol Monometiléter (CBDV), Cannabidiol-C₄(CBD-C₄), Ácido Cannabidivarínico (CBDVA), Cannabidivarina (CBDV), Cannabidiorcol (CBD-C₁), Ácido Tetrahydrocannabinólico A (THCA-A), Ácido Tetrahydrocannabinólico B (THCA-B), Ácido Tetrahydrocannabinólico (THCA), Tetrahydrocannabinol (THC), Ácido Tetrahydrocannabinólico C₄ (THCA-C₄), Tetrahydrocannabinol C₄ (THC-C₄), Ácido Tetrahydrocannabivarínico (THCVA), tetrahydrocannabivarina (THCV), ácido tetrahydrocannabiorcolico (THCA-C₁), Tetrahydrocannabiorcol(THC-C₁), Δ^7 -cis-iso-tetrahydrocannabivarina, ácido Δ^8 -tetrahydrocannabinólico(Δ^8 -THCA), Cannabivarinodiólico (CBNDVA), Cannabivarinodiol (CBNDV), Δ^8 -tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), Ácido Cannabiciclólico (CBLA), Cannabiciclol (CBL), Cannabiciclovarina (CBLV), Ácido Cannabielsóico A (CBEA-A), Ácido Cannabielsóico B (CBEA-B), Cannabielsoína (CBE), Cannabivarinselfoína (CBEV), Ácido Cannabivarinselfoínico (CBEVA), Ácido Cannabielsóico (CBEA), Cannabielvarinsoína (CBLV), Ácido Cannabielvarinsoínico Acid (CBLVA), Ácido Cannabinólico (CBNA), Cannabinol (CBN), Ácido Cannabivarínico (CBNVA), Cannabinol metiléter (CBNM), Cannabinol-C₄ (CBN-C₄), Cannabivarin (CBV), Cannabino-C₂ (CBN-C₂), Cannabiorcol (CBN-C₁), Cannabinodiol (CBND), ácido

cannabinodiólico (CBNDA), Cannabinodivarina (CBDV), Cannabitol (CBT), 10-etoxi-9-hidroxi- Δ^{6a} -tetrahydrocannabinol, 8,9-dihidroxi- $\Delta^{6a(10a)}$ -tetrahydrocannabinol (8,9-Di-OH-CBT- C_5), Cannabitolvarina (CBTV), Ethoxy-cannabitolvarina (CBTVE), Dehidrocannabifurano (DCBF), Cannabifurano (CBF), Cannabicromanon (CBCN), Cannabicitran (CBT), 10-Oxo- $\Delta^{6a(10a)}$ -tetrahydrocannabinol (OTHC), Δ^9 -cis-tetrahydrocannabinol (cis-THC), Cannabiripsol (CBR), 3,4,5,6-tetrahidro-7-hidroxi-alfa-alfa-2-trimethyl-9-n-propil-2,6-metano-2H-1-benzoxocin-5-metanol (OH-iso-HHCV), Trihidroxi-delta-9-tetrahydrocannabinol (triOH-THC), Yangonina, Galato de epigallocatequina, ácido Dodeca-2E, 4E, 8Z, 10Z- tetraenóico isobutilamida, y ácido dodeca-2E, 4E-dienóico isobutilamida.

En una realización, el segundo cannabinoide se elige entre Ácido cannabigerólico (CBGA), Monometiléter de ácido cannabigerólico (CBGAM), Cannabigerol (CBG), Monometiléter de cannabigerol (CBGM), Ácido Cannabigerovarínico (CBGVA), Cannabigerovarina (CBGV), Ácido cannabicroménico (CBCA), Cannabicromeno (CBC), Ácido Cannabicromevarínico (CBCVA), Cannabicromevarina (CBCV), Ácido Cannabidiólico (CBDA), Cannabidiol (CBD), Cannabidiol Monometiléter (CBDV), Cannabidiol- C_4 (CBD- C_4), Ácido Cannabidivarínico (CBDVA), Cannabidivarina (CBDV), Cannabidiorcol (CBD- C_1), Ácido Tetrahydrocannabinólico A (THCA-A), Ácido Tetrahydrocannabinólico B (THCA-B), Ácido Tetrahydrocannabinólico (THCA), Tetrahydrocannabinol (THC), Ácido Tetrahydrocannabinólico C_4 (THCA- C_4), Tetrahydrocannabinol C_4 (THC- C_4), Ácido Tetrahydrocannabivarínico (THCVA), Tetrahydrocannabivarina (THCV), Ácido Tetrahydrocannabiorcólico (THCA- C_1), Tetrahydrocannabiorcol (THC- C_1), Δ^7 -cis-iso-tetrahydrocannabivarina, ácido Δ^8 -tetrahydrocannabinólico (Δ^8 -THCA), Cannabivarinodiólico (CBNDVA), Cannabivarinodiol (CBNDV), Δ^8 -tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), Ácido Cannabiciclólico (CBLA), Cannabiciclol (CBL), Cannabiciclovarina (CBLV), Ácido Cannabielsóico A (CBEA-A), Ácido Cannabielsóico B (CBEA-B), Cannabielsoína (CBE), Cannabivarinselsoína (CBEV), Ácido Cannabivarinselsoínico (CBEVA), Ácido Cannabielsóico (CBEA), Cannabielvarinsolina (CBLV), Ácido Cannabielvarinsolínico Acid (CBLVA), Ácido Cannabinólico (CBNA), Cannabinol (CBN), Ácido Cannabivarínico (CBNVA), Cannabinol metiléter (CBNM), Cannabinol- C_4 (CBN- C_4), Cannabivarin (CBV), Cannabino- C_2 (CBN- C_2), Cannabiorcol (CBN- C_1), Cannabinodiol (CBND), ácido cannabinodiólico (CBNDA), Cannabinodivarina (CBDV), Cannabitol (CBT), 10-etoxi-9-hidroxi- Δ^{6a} -tetrahydrocannabinol, 8,9-dihidroxi- $\Delta^{6a(10a)}$ -tetrahydrocannabinol (8,9-Di-OH-CBT- C_5), Cannabitolvarina (CBTV), Ethoxy cannabitolvarina (CBTVE), Dehidrocannabifurano (DCBF), Cannabifurano (CBF), Cannabicromanon (CBCN), Cannabicitran (CBT), 10-Oxo- $\Delta^{6a(10a)}$ -tetrahydrocannabinol (OTHC), Δ^9 -cis-tetrahydrocannabinol (cis-THC), Cannabiripsol (CBR), 3,4,5,6-tetrahidro-7-hidroxi-alfa-alfa-2-trimethyl-9-n-propil-2,6-metano-2H-1-benzoxocin-5-

metanol (OH-iso-HHCV), Trihidroxi-delta-9-tetrahydrocannabinol (triOH-THC), Yangonina, Galato de epigallocatequina, ácido Dodeca-2E, 4E, 8Z, 10Z- tetraenóico isobutilamida, y ácido dodeca-2E, 4E-dienóico isobutilamida.

En una realización, el primer cannabinoide se elige entre THC, D9-THC, D8-THC, THCA, THCV, D8-THCV, D9-THCV, THCVA, CBD, CBDA, CBDV, CBDVA, CBC, CBCA, CBCV, CBCVA, CBG, CBGA, CBGV, CBGVA, CBN, CBNA, CBNV, CBNVA, CBND, CBNDVA, CBE, CBEA, CBEV, CBEVA, CBL, CBLA, CBLV, o CBLVA.

En una realización, el segundo cannabinoide se elige entre THC, D9-THC, D8-THC, THCA, THCV, D8-THCV, D9-THCV, THCVA, CBD, CBDA, CBDV, CBDVA, CBC, CBCA, CBCV, CBCVA, CBG, CBGA, CBGV, CBGVA, CBN, CBNA, CBNV, CBNVA, CBND, CBNDVA, CBE, CBEA, CBEV, CBEVA, CBL, CBLA, CBLV, o CBLVA.

En una realización, la planta del género cannabis comprende producir CBC en una proporción que no es natural con respecto al contenido total de cannabinoides. En una realización, la planta del género cannabis comprende una concentración de CBC de ocurrencia no natural.

En una realización, la planta del género cannabis comprende producir CBD en una proporción que no es natural con respecto al contenido total de cannabinoides. En una realización, la planta del género cannabis comprende una concentración de CBD de ocurrencia no natural.

En una realización, la planta del género cannabis comprende producir CBG en una proporción que no es natural con respecto al contenido total de cannabinoides. En una realización, la planta del género cannabis comprende una concentración de CBG de ocurrencia no natural.

En una realización, la planta del género cannabis comprende producir CBCA en una proporción que no es natural con respecto al contenido total de cannabinoides. En una realización, la planta del género cannabis comprende una concentración de CBCA de ocurrencia no natural.

En una realización, la planta del género cannabis comprende producir CBDA en una proporción que no es natural con respecto al contenido total de cannabinoides. En una realización, la planta del género cannabis comprende una concentración de CBDA de ocurrencia no natural.

En una realización, la planta del género cannabis comprende producir CBGA en una proporción que no es natural con respecto al contenido total de cannabinoides. En una realización, la planta del género cannabis comprende una concentración de CBGA de ocurrencia no natural.

En una realización, la planta del género cannabis comprende producir THCA en una proporción que no es natural con respecto al contenido total de cannabinoides. En una realización, la planta del género cannabis comprende una concentración de THCA de ocurrencia no natural.

En una realización, la planta del género cannabis comprende producir THCV en una proporción que no es natural con respecto al contenido total de cannabinoides. En una realización, la planta del género cannabis comprende una concentración de THCV de ocurrencia no natural.

En una realización, la planta del género cannabis comprende producir CBCV en una proporción que no es natural con respecto al contenido total de cannabinoides. En una realización, la planta del género cannabis comprende una concentración de CBCV de ocurrencia no natural.

En una realización, la planta del género cannabis comprende producir CBDV en una proporción que no es natural con respecto al contenido total de cannabinoides. En una realización, la planta del género cannabis comprende una concentración de CBDV de ocurrencia no natural.

En una realización, la planta del género cannabis comprende producir CBGV en una proporción que no es natural con respecto al contenido total de cannabinoides. En una realización, la planta del género cannabis comprende una concentración de CBGV de ocurrencia no natural.

En una realización, la planta del género cannabis comprende producir THCVA en una proporción que no es natural con respecto al contenido total de cannabinoides. En una realización, la planta del género cannabis comprende una concentración de THCVA de ocurrencia no natural.

En una realización, la planta del género cannabis comprende producir CBCVA en una proporción que no es natural con respecto al contenido total de cannabinoides. En una realización, la planta del género cannabis comprende una concentración de CBCVA de ocurrencia no natural.

En una realización, la planta del género cannabis comprende producir CBDVA en una proporción que no es natural con respecto al contenido total de cannabinoides. En una realización, la planta del género cannabis comprende una concentración de CBDVA de ocurrencia no natural.

En una realización, la planta del género cannabis comprende producir CBGVA en una proporción que no es natural con respecto al contenido total de cannabinoides. En una realización, la planta del género cannabis comprende una concentración de CBGVA de

ocurrencia no natural.

Como se usa en este documento, el término "cannabinoides" se refiere a un compuesto que pertenece a una clase de compuestos secundarios que se encuentran comúnmente en las plantas del género cannabis. En una realización, el cannabinoide se encuentra en una planta, por ejemplo, una planta del género cannabis. En una realización, el cannabinoide se denomina fitocannabinoides. En una realización, el cannabinoide se encuentra en un mamífero. En una realización, el cannabinoide se denomina como un endocannabinoides. En una realización, el cannabinoide se hace en un entorno de laboratorio. En una realización, el cannabinoide se denomina como un cannabinoide sintético. En una realización, el cannabinoide actúa sobre un receptor celular, como un receptor de proteína G-acoplado (por ejemplo, un receptor de serotonina, un receptor de cannabinoide, TRPV1, un receptor opioide, etc.) causando así una respuesta en el cerebro o el cuerpo. En una realización, el cannabinoide afecta la actividad de otros compuestos en uno o más receptores al actuar como agonista, agonista parcial, agonista inverso, antagonista, etc.

En muchos casos, un cannabinoide se puede identificar porque su nombre químico incluirá la cadena de texto ****cannabi*** en el nombre.

En el contexto de esta divulgación, cuando se hace referencia a un cannabinoide particular, cada una de las formas ácidas y/o descarboxiladas se contemplan como moléculas individuales y mezclas de las formas ácidas y/o descarboxiladas.

Como se usa en este documento, el término "compuesto secundario" se refiere a un compuesto no-vital requerido para la supervivencia de un organismo. En una realización, el compuesto secundario no está directamente involucrado en el crecimiento de un organismo. En una realización, el compuesto secundario no está involucrado directamente en el desarrollo de un organismo. En una realización, el compuesto secundario no participa directamente en la reproducción de un organismo. En una realización, el compuesto secundario es un cannabinoide. En una realización, el compuesto secundario es un terpeno.

Como se usa en este documento, el término "contenido total de cannabinoides" se refiere a la cantidad total de cannabinoides identificables dentro de una muestra, por ejemplo, una planta, una parte de planta, un extracto crudo de una planta, etc. En una realización, el contenido total de cannabinoides es la cantidad total de cannabinoides dentro de una planta del género cannabis. En una realización, el contenido total de cannabinoides es la cantidad total de cannabinoides dentro de un tricoma de una planta del género cannabis. En una realización, el contenido total de cannabinoides se expresa en masa, por ejemplo, gramos. En una realización, el contenido total de cannabinoides se expresa en moles. En una realización, el contenido total de cannabinoides se expresa en peso molecular. En una realización, el contenido total de cannabinoides se expresa

en peso seco.

Tal como se utiliza en el contexto de esta solicitud, el término "hecho por el hombre" significa diseñado o hecho a propósito por el hombre en contraste con lo que ocurre naturalmente "en la naturaleza" que se produce sin influencia humana. En una realización, las plantas hechas por el hombre son plantas fabricadas mediante la manipulación del código genético de una planta para expresar una o más características de forma no natural.

Como se usa en este documento, el término "que ocurre naturalmente" se refiere a materializar, surgir, suceder, o sintetizar en la naturaleza. En una realización, que ocurre naturalmente se refiere a un compuesto secundario sintetizado dentro de una planta. En una realización, que ocurre naturalmente se refiere a una colección de cannabinoides sintetizados dentro de una planta del género cannabis. En una realización, que ocurre naturalmente se refiere a las concentraciones de compuestos dentro de una planta.

En una realización, que ocurre naturalmente se refiere a la concentración de cannabinoides dentro de una planta del género cannabis. En una realización, que ocurre naturalmente se refiere a la proporción de un compuesto secundario a todos los compuestos secundarios dentro de una planta. En una realización, que ocurre naturalmente se refiere a la proporción de un primer cannabinoide con respecto al contenido total de cannabinoides dentro de una planta del género cannabis.

Como se usa en este documento, el término "proporción natural" se refiere a la proporción de un compuesto o compuestos en relación con otro compuesto o compuestos dentro de una planta natural del género cannabis. En una realización, la proporción natural es la cantidad de un primer cannabinoide en relación con el contenido total de cannabinoides dentro de una planta del género cannabis. En una realización, la proporción natural se expresa como una relación molar. En una realización, la proporción natural se expresa como una proporción de masa. En una realización, la proporción de masa y/o molar se mide por cromatografía y/o espectroscopia, por ejemplo, HPLC, GC y/o espectroscopia de masas. En una realización, la proporción natural se expresa como un peso seco.

Como se usa en este documento, el término "proporción no natural" se refiere a la proporción de un compuesto o compuestos en relación con otro compuesto o compuestos en una composición, por ejemplo, una planta, una sustancia derivada de una planta como un extracto crudo, creada por el hombre. En una realización, la proporción no natural es la cantidad de un primer cannabinoide en relación con el contenido total de cannabinoides y no se observa en una planta natural del género cannabis. En una realización, la proporción no natural se expresa como una relación molar. En una realización, la proporción no natural se expresa en proporción de peso en seco. En una realización, la proporción no natural se expresa como una proporción de masa.

En una realización, la proporción de masa y/o molar se mide por cromatografía y/o espectroscopia, por ejemplo, HPLC, GC, y/o espectroscopia de masas. En una realización, la proporción no natural ocurre como resultado de la modificación genética de una planta del género cannabis. En una realización, la proporción no natural comprende una concentración de ocurrencia no natural de un primer cannabinoide y una concentración de ocurrencia natural del contenido total de cannabinoides. En una realización, la proporción no natural comprende una proporción natural de un primer cannabinoide y una concentración de ocurrencia no natural del contenido total de cannabinoides. En una realización, la proporción no natural comprende una proporción no natural de un primer cannabinoide y una concentración de ocurrencia no natural del contenido total de cannabinoides.

Como se usa en este documento, el término "concentración de ocurrencia natural" se refiere a la cantidad, por ejemplo, porcentaje en masa, masa, moles, etc., de un compuesto o compuestos en relación con una muestra completa de referencia de ocurrencia natural. Por ejemplo, el porcentaje de THC dentro de una planta del género cannabis que no se ha modificado como se describe en esta divulgación. En una realización, la concentración de ocurrencia natural es el porcentaje de masa de un cannabinoide en una muestra de una planta del género cannabis. En una realización, la concentración de ocurrencia natural es la masa de un cannabinoide dentro de la flor seca o curada de una planta del género cannabis. En una realización, la concentración de ocurrencia natural es el peso seco de un primer cannabinoide dentro de un extracto crudo de una planta del género cannabis.

Tal como se usa en este documento, el término "concentración de ocurrencia no natural" se refiere a la cantidad, por ejemplo, porcentaje en masa, masa, moles, etc., de un compuesto o compuestos en relación con una muestra completa dentro de una composición hecha por el hombre. Por ejemplo, el porcentaje de THC dentro de una planta del género cannabis modificado como se describe en esta divulgación. En una realización, la concentración de ocurrencia no natural es el peso molecular de un primer cannabinoide en relación con el contenido total de cannabinoides. En una realización, la concentración de ocurrencia no natural se mide mediante moles y expresado como molaridad. En una realización, la concentración de ocurrencia no natural se mide por porcentaje de masa. En una realización, la concentración de ocurrencia no natural se mide por peso seco. En una realización, la concentración de ocurrencia no natural se produce como resultado de la modificación genética de una planta del género cannabis.

En una realización, la planta del género cannabis que comprende el primer cannabinoide comprende 10 - 50% del contenido total de cannabinoides en peso seco y el segundo cannabinoide comprende 0 - 10% en peso seco del contenido total de cannabinoides.

En una realización, la planta del género cannabis que comprende el primer cannabinoide

comprende 15 - 45% del contenido total de cannabinoides en peso seco y el segundo cannabinoide comprende 0,5 - 7,5% en peso seco del contenido total de cannabinoides.

En una realización, la planta del género cannabis que comprende el primer cannabinoide comprende 20 - 40% del contenido total de cannabinoides en peso seco y el segundo cannabinoide comprende 1 - 5% en peso seco del contenido total de cannabinoides.

En una realización, la planta del género cannabis que comprende el primer cannabinoide comprende 25 - 35% del contenido total de cannabinoides en peso seco y el segundo cannabinoide comprende 1,5 - 2,5% en peso seco del contenido total de cannabinoides.

En una realización, la planta del género cannabis comprende un tercer cannabinoide. En una realización, la planta del género cannabis comprende un cuarto cannabinoide. En una realización, la planta del género cannabis comprende más de cuatro cannabinoides.

Como se usa en este documento, el término "masa total" se refiere a la cantidad total de materia para una muestra de referencia dada. En una realización, la masa total se mide por masa molecular. En una realización, la masa total se mide por masa, por ejemplo, gramos. En una realización, la masa total es el peso seco de una planta del género cannabis. En una realización, la masa total es el peso seco de un extracto crudo de una planta del género cannabis. En una realización, la masa total es el peso seco de un extracto purificado de una planta del género cannabis después de eliminar toda el agua.

En el presente documento se describen nuevos métodos para producir una planta del género cannabis que comprende comparar la secuencia génica de dos plantas, correlacionar las diferencias de secuencia con un fenotipo de interés, y modificar el genoma de una planta para reforzar la expresión del fenotipo deseado. En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden la sobreexpresión de una secuencia génica. En una realización, los métodos descritos en el presente documento comprenden subexpresar una secuencia génica. En una realización, los métodos descritos en el presente documento comprenden manipular la ruta biosintética de los cannabinoides.

En el presente documento se describen nuevas plantas del género cannabis que comprenden material genético modificado, en donde el material genético modificado afecta a las enzimas asociadas con la producción de compuestos secundarios. En una realización, el material genético modificado codifica la CBCA sintasa. En una realización, el material genético modificado codifica CBDA sintasa. En una realización, el material genético modificado codifica la THCA sintasa. En una realización, el material genético modificado codifica el ácido olivetólico ciclase. En una realización, el material genético modificado codifica la tetracétido sintasa. En una realización, el material genético modificado codifica la preniltransferasa aromática.

En el presente documento se describe un nuevo método para regular la biosíntesis de

cannabinoides en una planta del género cannabis mediante la destrucción de enzimas que facilitan la síntesis de cannabinoides. En una realización, destruir comprende mutar un gen. En una realización, destruir comprende interferir con la expresión génica. En una realización, destruir comprende escindir genes dentro de un genoma.

Como se usa en este documento, el término "destruir" significa inhibir una enzima y/o un compuesto involucrado en la biosíntesis de un cannabinoide. En una realización, destruir comprende inhibir la expresión de una enzima. En una realización, destruir comprende aumentar la producción de promotores.

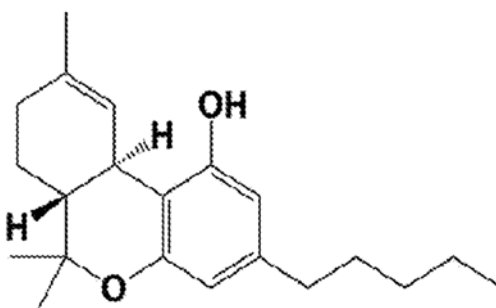
Tal como se usa en este documento, el término "planta" significa un eucariota multicelular del reino Plantae, ya sea de origen natural, completamente hecha por el hombre, o alguna combinación de los mismos. En una realización, la planta es del género cannabis. En una realización, la planta es una parte de una planta, por ejemplo, una hoja, una raíz, un tallo, etc. En una realización, la planta se seca, por ejemplo, deshidratándola en un horno.

Como se usa en este documento, el término "género cannabis" se refiere a un organismo que pertenece al género *Cannabis* dentro del sistema taxonómico biológico. En una realización, el género cannabis comprende la especie *Cannabis sativa*. En una realización, el género cannabis comprende la especie *Cannabis indica*. En una realización, el género cannabis comprende la especie *Cannabis ruderalis*. En una realización, el género cannabis comprende varias cepas.

Como se usa en este documento, el término "flor" dentro del contexto de esta divulgación se refiere a una estructura reproductiva de una planta del género cannabis, que incluye plantas masculinas, femeninas, y/o hermafroditas. El término "flor" también abarca cualquier parte o compuesto involucrado en o creado durante el proceso de floración.

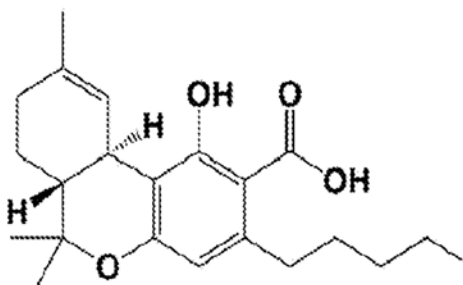
En una realización, el término flor incluye un brote producido al final de la etapa de floración. En una realización, el término flor incluye un tricoma, que produce compuestos secundarios, por ejemplo, cannabinoides, terpenos, etc. En una realización, el término flor incluye material vegetal vendido comercialmente para uso o procesamiento recreativo y/o médico.

Como se usa en este documento, el término "THC" se refiere a tetrahidrocannabinol y tiene la siguiente fórmula estructural:



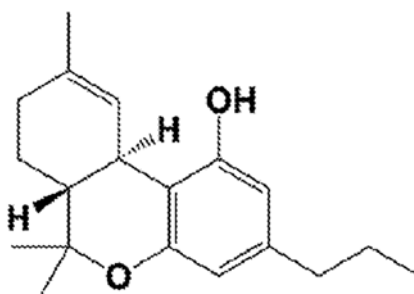
En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir THC en niveles controlados.

Tal como se usa en este documento, el término "THCA" se refiere al ácido tetrahidrocannabinólico y tiene la siguiente fórmula estructural:



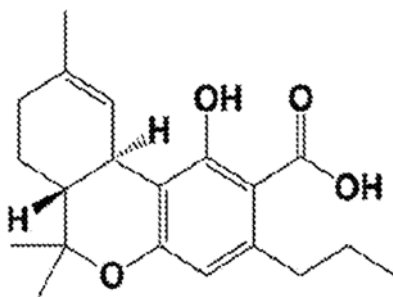
La descarboxilación de THCA con calor, luz, etc., forma THC, D8-THC, D9-THC y otros cannabinoides potenciales. En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir THCA en niveles controlados.

Como se usa en este documento, el término "THCV" se refiere a tetrahidrocannabivarina y tiene la siguiente fórmula estructural:



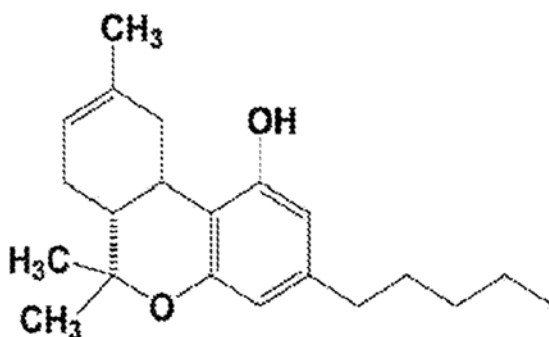
En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir THCV en niveles controlados.

Como se usa en este documento, el término "THCVA" se refiere al ácido tetrahidrocannabivarínico y tiene la siguiente fórmula estructural:



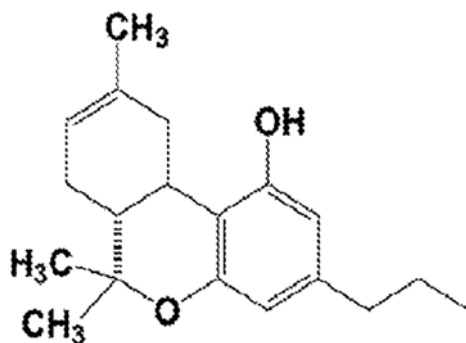
La descarboxilación de THCVA con calor, luz, etc., forma THCV, D8-THCV, D9-THCV y otros posibles derivados de cannabinoides. En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir THCVA en niveles controlados.

Como se usa en este documento, el término "D8-THC" se refiere a delta-8-tetrahidrocannabinol y tiene la siguiente fórmula estructural:



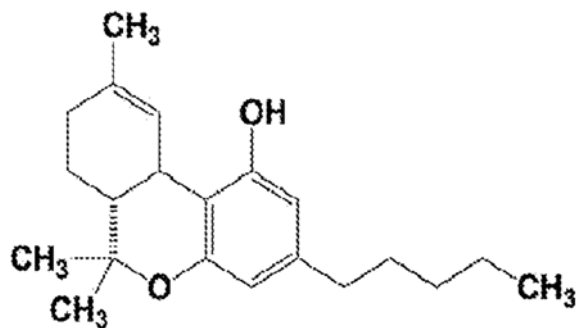
En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir D8-THC en niveles controlados.

Como se usa en este documento, el término "D8-THCV" se refiere a delta-8-tetrahidrocannabivarina y tiene la siguiente fórmula estructural:



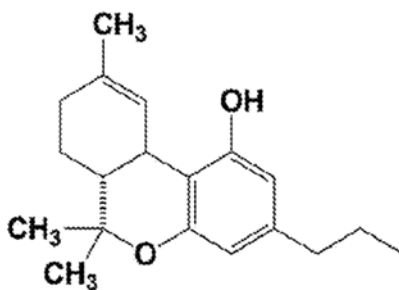
En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir D8-THCV en niveles controlados.

Como se usa en este documento, el término "D9-THC" se refiere a delta-9-tetrahidrocannabinol y tiene la siguiente fórmula estructural:



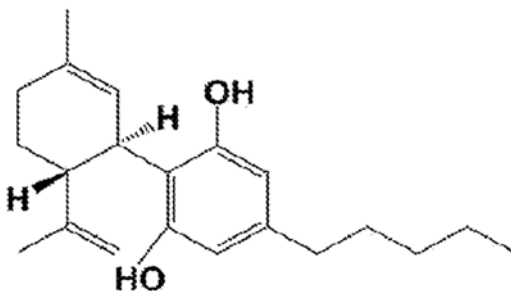
En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir D9-THC en niveles controlados.

Como se usa en este documento, el término "D9-THCV" se refiere a delta-9-tetrahidrocannabivarina y tiene la siguiente fórmula estructural:



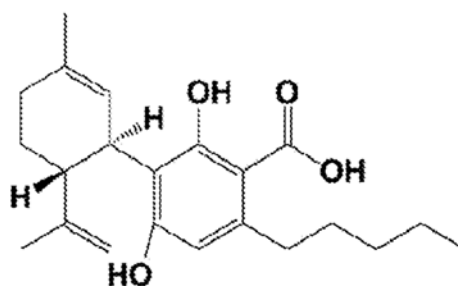
En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir D9-THCV en niveles controlados.

Como se usa en este documento, el término "CBD" se refiere a cannabidiol y tiene la siguiente fórmula estructural:



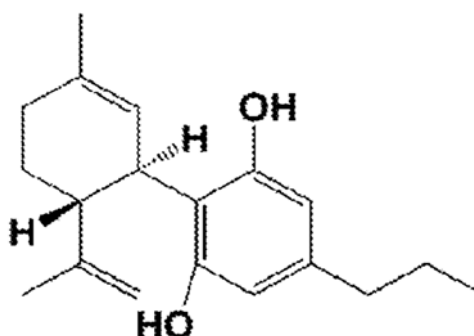
En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir CBD en niveles controlados.

Como se usa en este documento, el término "CBDA" se refiere al ácido cannabidiolico y tiene la siguiente fórmula estructural:



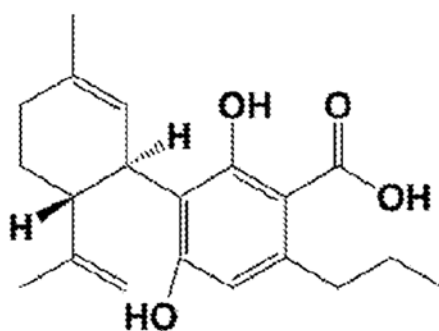
La descarboxilación de CBDA con calor, luz, etc., forma CBD y otros posibles derivados de cannabinoides. En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir CBDA en niveles controlados.

Como se usa en este documento, el término "CBDV" se refiere a la cannabidivarina y tiene la siguiente fórmula estructural:



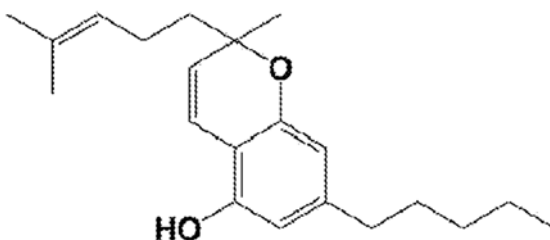
En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir CBDV en niveles controlados.

Tal como se usa en este documento, el término "CBDVA" se refiere al ácido cannabidivarinico y tiene la siguiente fórmula estructural:



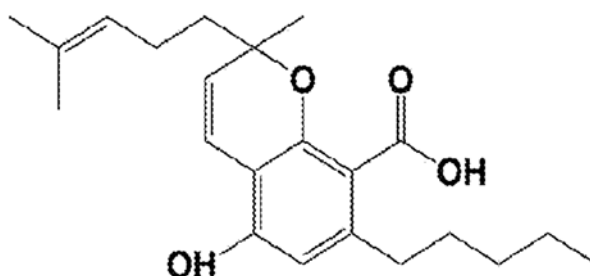
La descarboxilación de CBDVA con calor, luz, etc., forma CBDV y otros posibles derivados cannabinoides. En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir CBDVA en niveles controlados.

Como se usa en este documento, el término "CBC" se refiere a cannabicromeno y tiene la siguiente fórmula estructural:



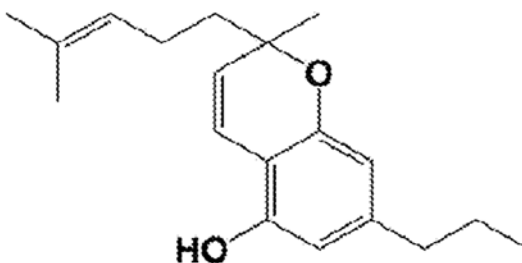
En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir CBC en niveles controlados.

Como se usa en este documento, el término "CBCA" se refiere al ácido cannabícroménico y tiene la siguiente fórmula estructural:



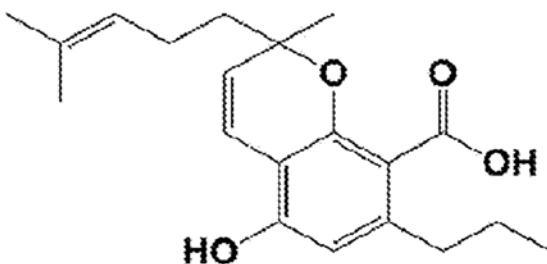
La descarboxilación de CBCA con calor, luz, etc., forma CBC y otros posibles derivados de cannabinoides. En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir CBCA en niveles controlados.

Como se usa en este documento, el término "CBCV" se refiere a cannabícromevarina y tiene la siguiente fórmula estructural:



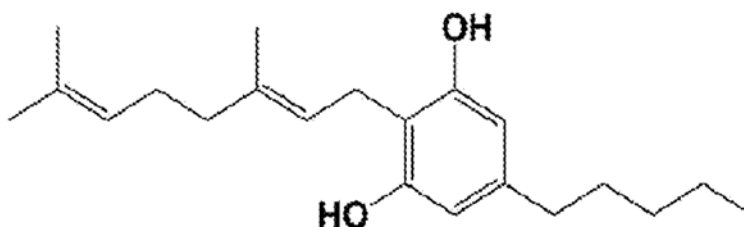
En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir CBCV en niveles controlados.

Como se usa en este documento, el término "CBCVA" se refiere al ácido cannabícromevarínico y tiene la siguiente fórmula estructural:



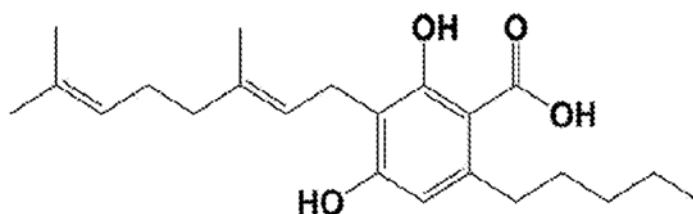
La descarboxilación de CBCVA con calor, luz, etc., forma CBCV y otros posibles derivados de cannabinoides. En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir CBCVA en niveles controlados.

Tal como se usa en este documento, el término "CBG" se refiere al cannabigerol y tiene la siguiente fórmula estructural:



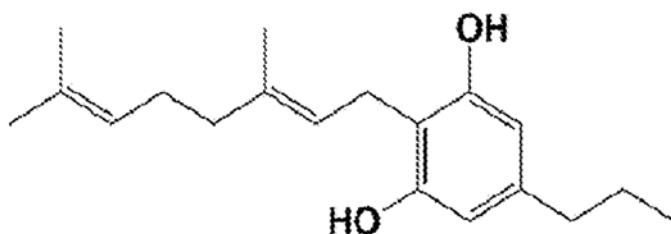
En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir CBG en niveles controlados.

Tal como se usa en este documento, el término "CBGA" se refiere al ácido cannabigerólico y tiene la siguiente fórmula estructural:



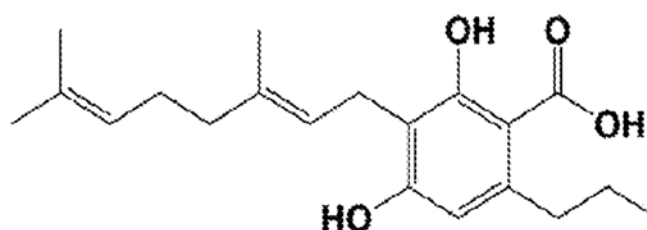
La descarboxilación de CBGA con calor, luz, etc., forma CBG y otros posibles derivados de cannabinoides. En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir CBGA en niveles controlados.

Como se usa en este documento, el término "CBGV" se refiere a cannabigerovarina y tiene la siguiente fórmula estructural:



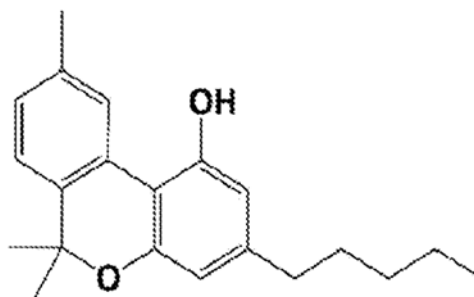
En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir CBGV en niveles controlados.

Tal como se usa en este documento, el término "CBGVA" se refiere al ácido cannabigerovarínico y tiene la siguiente fórmula estructural:



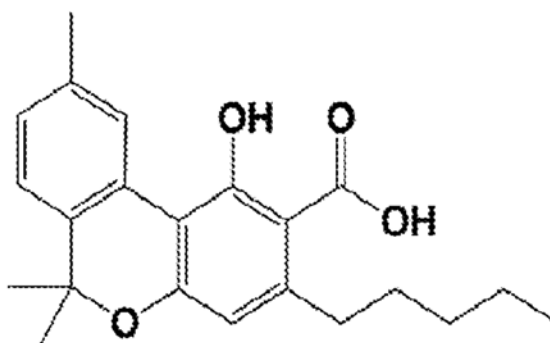
La descarboxilación de CBGVA con calor, luz, etc., forma CBGV y otros posibles derivados de cannabinoides. En el contexto de esta descripción, las plantas del género cannabis se modifican para producir CBGVA en niveles controlados.

Como se usa en este documento, el término "CBN" se refiere al cannabinol y tiene la siguiente fórmula estructural:



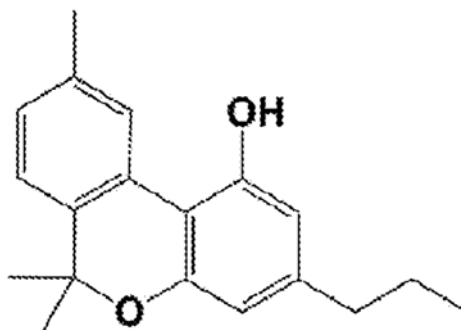
En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir CBN en niveles controlados.

Como se usa en este documento, el término "CBNA" se refiere al ácido cannabinólico y tiene la siguiente fórmula estructural:



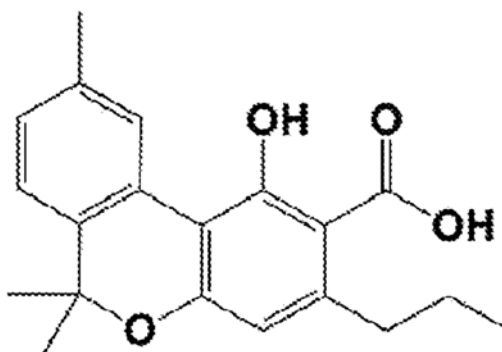
La descarboxilación de CBNA con calor, luz, etc., forma CBN y otros posibles derivados de cannabinoides. En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir CBNA en niveles controlados.

Como se usa en este documento, el término "CBNV" o "CBV" se refiere a la cannabivarina y tiene la siguiente fórmula estructural:



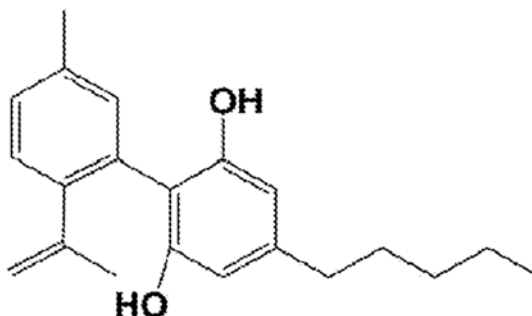
En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir CBNV en niveles controlados.

Como se usa en este documento, el término "CBNVA" se refiere al ácido cannabivarínico y tiene la siguiente fórmula estructural:



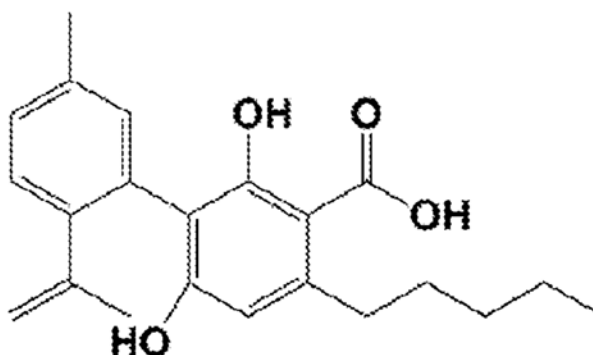
La descarboxilación del CBNVA con calor, luz, etc., forma el CBNV y otros posibles derivados de cannabinoides. En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir CBNVA en niveles controlados.

Tal como se usa en este documento, el término "CBND" se refiere a cannabinodiol y tiene la siguiente fórmula estructural:



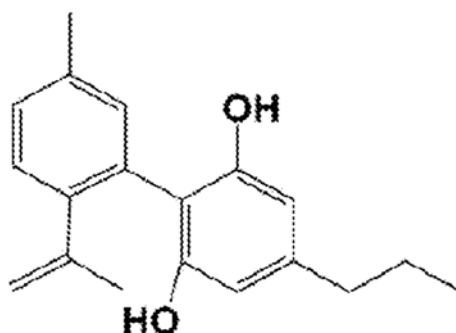
En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir CBND en niveles controlados.

Como se usa en este documento, el término "CBNDA" se refiere al ácido cannabinodiólico y tiene la siguiente fórmula estructural:



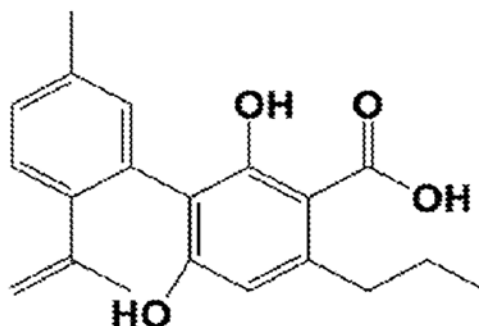
La descarboxilación de CBNDA con calor, luz, etc., forma CBND y otros posibles derivados de cannabinoides. En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir CBNDA en niveles controlados.

Como se usa en este documento, el término "CBNDV" se refiere a cannabivarinodiol y tiene la siguiente fórmula estructural:



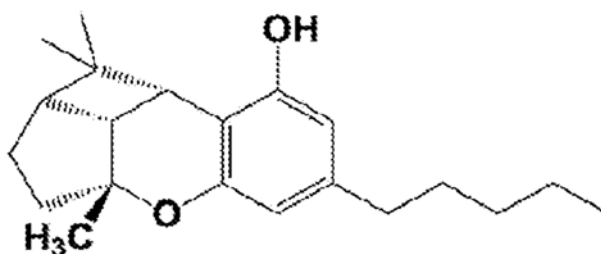
En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir CBNDV en niveles controlados.

Como se usa en este documento, el término "CBNDVA" se refiere al ácido cannabivarinodiolico y tiene la siguiente fórmula estructural:



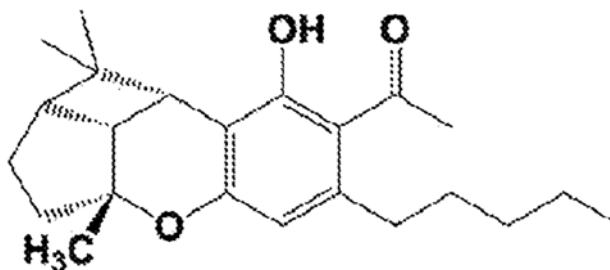
La descarboxilación de CBNDVA con calor, luz, etc., forma CBNDV y otros posibles derivados de cannabinoides. En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir CBNDVA en niveles controlados.

Tal como se usa en este documento, el término "CBL" se refiere a cannabicitol y tiene la siguiente fórmula estructural:



En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir CBL en niveles controlados.

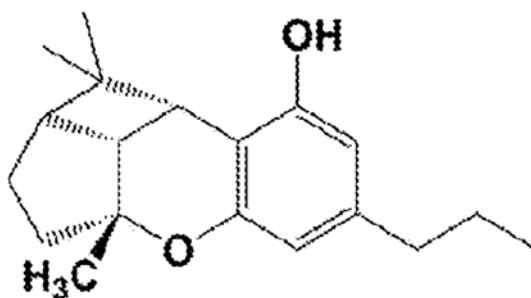
Como se usa en este documento, el término "CBLA" se refiere al ácido cannabicitólico y tiene la siguiente fórmula estructural:



La descarboxilación de CBLA con calor, luz, etc., forma CBL y otros posibles derivados de cannabinoides. En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir CBLA en niveles controlados.

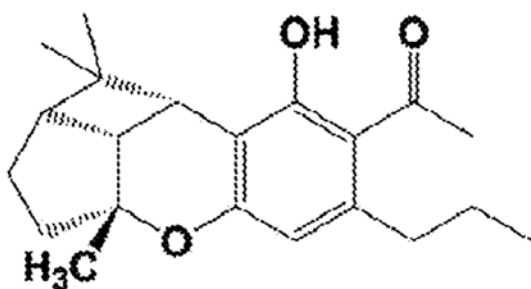
Tal como se usa en este documento, el término "CBLV" se refiere a cannabicitlovarena y

tiene la siguiente fórmula estructural:



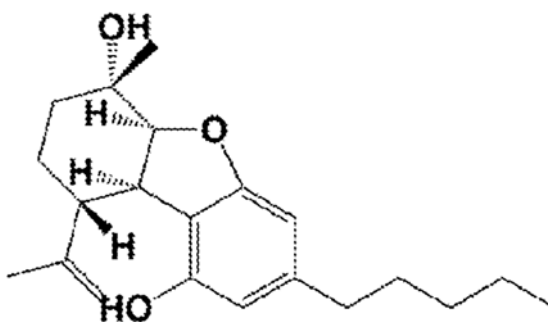
En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir CBLV en niveles controlados.

Como se usa en este documento, el término "CBLVA" se refiere al ácido cannabielvarinsoínico y tiene la siguiente fórmula estructural:



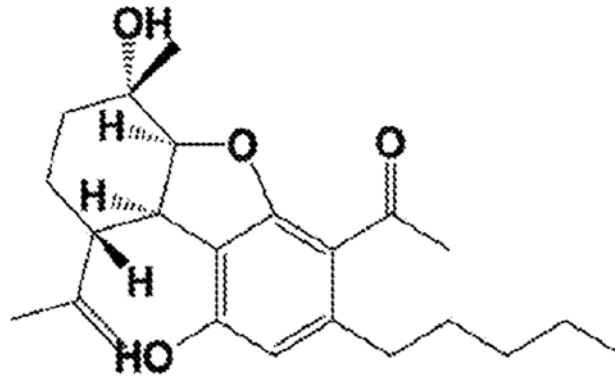
La descarboxilación de CBLVA con calor, luz, etc., forma CBLV y otros posibles derivados de cannabinoides. En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir CBLVA en niveles controlados.

Como se usa en este documento, el término "CBE" se refiere a cannabielsoína y tiene la siguiente fórmula estructural:



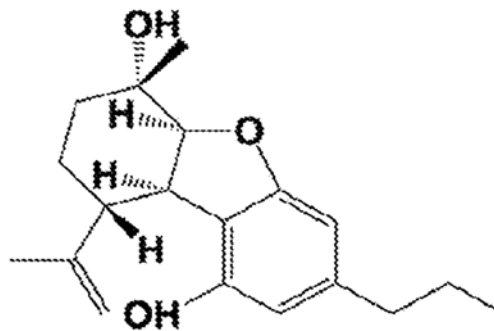
En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir CBE en niveles controlados.

Como se usa en este documento, el término "CBEA" se refiere al ácido cannabielsóico y tiene la siguiente fórmula estructural:



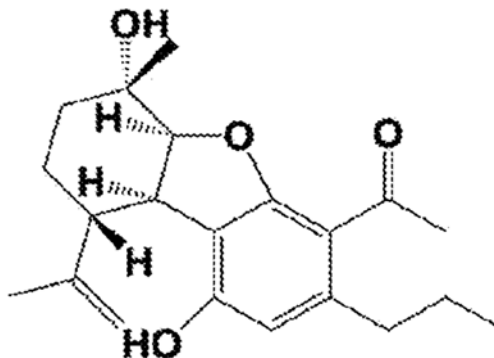
La descarboxilación de CBEA con calor, luz, etc., forma CBE y otros posibles derivados de cannabinoides. En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir CBEA en niveles controlados.

Tal como se usa en este documento, el término "CBEV" se refiere a cannabivarinselsoina y tiene la siguiente fórmula estructural:



En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se modifican para producir CBEV en niveles controlados.

Como se usa en este documento, el término "CBEVA" se refiere al ácido cannabivarinselsoínico y tiene la siguiente fórmula estructural:



La descarboxilación de CBEVA con calor, luz, etc., forma CBEV y otros posibles derivados de cannabinoides. En el contexto de esta divulgación, las plantas del género cannabis se

modifican para producir CBEVA en niveles controlados.

Como se usa en este documento, el término "peso seco" se refiere a la masa de una muestra después de eliminar sustancialmente toda el agua dentro de la muestra. Cualquier método adecuado para eliminar agua es aceptable. Los métodos ejemplares para eliminar agua incluyen: colocar la planta en un deshidratador, colocar la planta en un horno, colocar un desecante con la planta en un recipiente, y/o colocar la planta debajo de una lámpara.

En un ejemplo, una planta se tritura y se determina el número de compuestos estructuralmente distintos. En una realización, la abundancia, por ejemplo, el porcentaje de masa o el número de compuestos, de la muestra se determina mediante técnicas conocidas en la técnica. Las técnicas ejemplares para determinar la abundancia, por ejemplo, el porcentaje de masa o el número de compuestos, incluyen cromatografía de capa fina, cromatografía de líquidos de alto rendimiento, cromatografía de gases, espectrometría de masas de cromatografía de gases, cromatografía de fluidos supercríticos, etc.

En una realización, el cálculo del porcentaje en peso seco para un compuesto dentro de una mezcla (como un primer cannabinoide dentro de una flor seca después de eliminar sustancialmente toda el agua) se realiza con la siguiente fórmula:

$$(\text{Masa total del primer cannabinoide} / \text{Masa total de la muestra después de eliminar el agua}) * 100\%$$

Como se usa en este documento, el término "genoma" se refiere a la secuencia completa de material genético de un organismo. El genoma de un organismo contiene toda la información necesaria para construir el organismo a través de procesos naturales y reacciones dentro del organismo. Cambiar o modificar ciertas partes del genoma afecta la forma en que el organismo expresa ciertas características o características. En una realización, el genoma de un organismo se cambia para producir un primer cannabinoide en una proporción no natural con respecto al contenido total de cannabinoides. En una realización, el genoma de un organismo se cambia para producir un primer cannabinoide en una proporción no natural con respecto a un segundo cannabinoide. En una realización, el genoma de un organismo se cambia para producir un primer cannabinoide en una concentración de ocurrencia no natural dentro de una planta del género cannabis.

Como se usa en este documento, el término "material genético" se refiere a la información encontrada en un organismo que dirige y/o dicta procesos biológicos dentro del organismo. El material genético comprende ARN, ADN, cualquier estructura compuesta de ADN y/o ARN, por ejemplo, genes, proteínas, etc., derivados de ADN y/o ARN, por ejemplo, ARNm, ADNc, etc., o cualquier combinación de estos. El genoma de un organismo contiene toda la información

necesaria para construir el organismo a través de procesos y reacciones naturales dentro del organismo.

Como se usa en este documento, el término "material genético modificado" se refiere a material genético que se cambia del material genético que se produce naturalmente, por ejemplo, ADN y/o ARN, codificante o no codificante. En una realización, el material genético modificado es ADN mutado. En una realización, el material genético modificado es una secuencia génica alterada correspondiente a una enzima.

Como se usa en este documento, el término "CBCA sintasa" se refiere a una enzima que actúa como un catalizador para convertir CBGVA en CBCVA y/o CBGA en CBCA.

Como se usa en este documento, el término "gen de expresión de la CBCA sintasa" se refiere a un gen que codifica la enzima CBCA sintasa.

Como se usa en este documento, el término "CBDA sintasa" se refiere a una enzima que actúa como un catalizador para convertir CBGVA en CBDVA y/o CBGA en CBDA.

Como se usa en este documento, el término "gen de expresión de la CBDA sintasa" se refiere a un gen que codifica la enzima CBDA sintasa.

Como se usa en este documento, el término "THCA sintasa" se refiere a una enzima que actúa como un catalizador para convertir CBGVA en THCVA y/o CBGA en THCA.

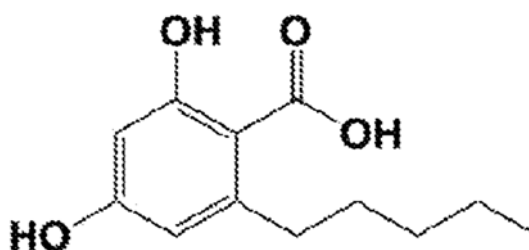
Como se usa en este documento, el término "gen de expresión de THCA sintasa" se refiere a un gen que codifica la enzima THCA sintasa.

Como se usa en este documento, el término "ácido olivetólico ciclasa" se refiere a una enzima que actúa como un catalizador para formar ácido olivetólico.

Como se usa en este documento, el término "tetracétido sintasa" se refiere a una enzima que actúa como un catalizador para formar ácido olivetólico.

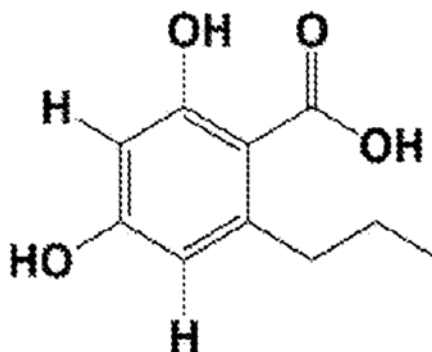
Tal como se usa en este documento, el término "preniltransferasa aromática" se refiere a una enzima que actúa como un catalizador para convertir sustratos precursores en CBGA y/o CBGVA. En una realización, los sustratos precursores son ácido olivetólico y geranil difosfato. En una realización, los sustratos precursores son ácido divarinólico y difosfato de germania.

Como se usa en este documento, el término "ácido olivetólico" se refiere a un compuesto de la siguiente fórmula estructural:



El ácido olivetólico está involucrado en la biosíntesis de CBGA, en donde el ácido olivetólico se combina con geranil difosfato a través de enzimas preniltransferasa. En una realización, la enzima preniltransferasa es preniltransferasa aromática.

Como se usa en este documento, el término "ácido divarinólico" se refiere a un compuesto de la siguiente fórmula estructural:



El ácido divarinólico participa en la biosíntesis de CBGVA, en donde el ácido divarinólico se combina con geranil difosfato a través de enzimas preniltransferasa. En una realización, la enzima preniltransferasa es preniltransferasa aromática.

En una realización, las plantas descritas en el presente documento comprenden material genético modificado en el que el material genético modificado comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima de síntesis de cannabinoides.

Como se usa en este documento, el término "secuencia de ácido nucleico" se refiere a una serie de nucleótidos acoplados entre sí mediante enlaces covalentes. Las secuencias de ácidos nucleicos a menudo están representadas por una serie de letras con cada letra representando un nucleótido individual. En una realización, los nucleótidos para ARN son U para uracilo, G para guanina, C para citosina, y A para adenina. En una realización, los nucleótidos para ADN son T para timina, G para guanina, C para citosina, y A para adenina.

En una realización, la secuencia de ácido nucleico codifica una proteína funcional. En una realización, la secuencia de ácido nucleico no codifica una proteína funcional. En una realización, la secuencia de ácido nucleico indica el orden de los nucleótidos dentro del ADN. En una realización, la secuencia de ácido nucleico indica el orden de los nucleótidos dentro del ARN. Dentro de la técnica, cuando se hace referencia a una secuencia de ácido nucleico, el término "secuencia de nucleótidos" también se puede usar indistintamente.

Como se usa en este documento, el término "enzima de síntesis de cannabinoides" se refiere a una proteína que actúa como un catalizador para producir uno o más cannabinoides en una planta del género cannabis.

Los ejemplos de enzimas de síntesis de cannabinoides en el contexto de esta divulgación

incluyen, pero no se limitan a: policétido sintasa (PKS), ácido olivetólico ciclasa (OAC), tetracétido sintasa (TKS), PKS tipo III, calcona sintasa (CHS), preniltransferasa, THCA sintasa, CBDA sintasa, CBCA sintasa, GPP sintasa, FPP sintasa, limoneno sintasa, preniltransferasa aromática, y geranilfosfato: olivetolato geraniltransferasa.

En este documento se describe un método para controlar la síntesis de cannabinoides en una planta del género cannabis, que comprende:

manipular la expresión de un gen que codifica una enzima de síntesis de cannabinoides.

Como se usa en este documento, el término "control" se refiere a dirigir, gobernar, guiar y/o manipular la cantidad de un cannabinoide o cannabinoides producidos en una planta del género cannabis. En una realización, el control comprende la modificación de una planta del género cannabis para producir una concentración de ocurrencia no natural de un primer cannabinoide. En una realización, el control comprende la modificación de una planta del género cannabis para producir una proporción de ocurrencia no natural de un primer cannabinoide. En una realización, el control comprende la modificación de una planta del género cannabis para producir una concentración de ocurrencia no natural de un segundo cannabinoide. En una realización, el control comprende la modificación de una planta del género cannabis para producir una proporción no natural de un segundo cannabinoide.

Como se usa en este documento, el término "expresión de un gen" se refiere a la capacidad de una planta para utilizar información del material genético para producir productos génicos funcionales. En el contexto de esta divulgación, la expresión pretende abarcar la capacidad de la planta para producir proteínas, como enzimas, y varias otras moléculas del material genético de la planta. En una realización, la planta expresa enzimas de síntesis de cannabinoides para la biosíntesis de cannabinoides. En una realización, la planta produce ARN a partir de una plantilla de ADN.

Como se usa en este documento, el término "manipular la expresión de un gen" se refiere a cambiar intencionalmente el genoma de una planta del género cannabis para controlar la expresión de ciertas características.

En una realización, el genoma de la planta se manipula para expresar menos CBDA sintasa. En una realización, el genoma de la planta se manipula para expresar menos THCA sintasa. En una realización, el genoma de la planta se manipula para expresar menos CBCA sintasa. En una realización, el genoma de la planta se manipula para expresar menos ácido olivetólico ciclasa. En una realización, el genoma de la planta se manipula para expresar menos tetracétido sintasa. En una realización, el genoma de la planta se manipula para expresar menos preniltransferasa aromática.

En una realización, el genoma de la planta se manipula para expresar más CBDA sintasa.

En una realización, el genoma de la planta se manipula para expresar más THCA sintasa. En una realización, el genoma de la planta se manipula para expresar más CBCA sintasa. En una realización, el genoma de la planta se manipula para expresar más ácido olivetólico ciclasa. En una realización, el genoma de la planta se manipula para expresar más tetracétido sintasa. En una realización, el genoma de la planta se manipula para expresar más preniltransferasa aromática.

Como se usa en este documento, el término "codificante" se refiere a almacenar información genética y acceder a la información genética para producir productos génicos funcionales. En una realización, un gen es codificante para una proteína. En una realización, un gen es codificante para un catalizador. En una realización, una cadena de ADN incluye material genético que es codificante para la tasa de crecimiento de una planta del género cannabis. En una realización, una cadena de ARNm es codificante para una proteína, como una enzima de síntesis de cannabinoides.

En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden:

seleccionar una primera planta del género cannabis;

seleccionar una segunda planta del género cannabis, en donde la primera planta del género cannabis produce un primer cannabinoide más que la segunda planta del género cannabis;

recolectar material genético de la primera planta del género cannabis;

recolectar material genético de la segunda planta del género cannabis;

comparar el material genético de la primera planta del género cannabis con el material genético de la segunda planta del género cannabis; y

identificar una diferencia en una secuencia de genes presente dentro del material genético de la primera planta del género cannabis homóloga a una secuencia de genes presente dentro del material genético de la segunda planta del género cannabis.

Como se usa en este documento, el término "seleccionar una primera planta del género cannabis" se refiere a elegir una planta del género cannabis que produce una cantidad particular de un primer cannabinoide medido por peso seco. En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden la selección de una segunda planta del género cannabis. En una realización, la selección comprende elegir una planta del género cannabis mediante análisis cuantitativo de un extracto crudo, HPLC, técnicas de espectrometría, etc.

En una realización, la primera planta del género cannabis es de una especie diferente a la segunda planta del género cannabis. En una realización, la primera planta del género cannabis es de la misma especie que la segunda planta del género cannabis. En una realización, la primera planta del género cannabis es de una cepa diferente a la segunda planta del género cannabis. En una realización, la primera planta del género cannabis proviene de la misma cepa que la

segunda planta del género cannabis. En una realización, la primera planta del género cannabis es del mismo ancestro que la segunda planta del género cannabis. En una realización, la primera planta del género cannabis proviene del mismo progenitor que la segunda planta del género cannabis. En una realización, la primera planta del género cannabis es del mismo género que la segunda planta del género cannabis. En una realización, la primera planta del género cannabis es de un género diferente a la segunda planta del género cannabis.

Como se usa en este documento, el término "recolectar material genético" se refiere a la recolección de información encontrada en un organismo que dirige y/o dicta procesos biológicos dentro del organismo. En una realización, la recolección de material genético comprende extraer un extracto crudo de una planta del género cannabis. Los métodos de extracción incluyen, pero no se limitan a, métodos de extracción orgánicos, formatos de canasta rotatoria basados en filtros, métodos de partículas magnéticas, extracción líquido-líquido, y métodos de lisis directa. En una forma de realización, la recolección de material genético comprende la extracción de ARN. El material genético comprende la extracción de ADN.

En una realización, la recolección de material genético comprende preparar una solución acuosa de material vegetal de una planta del género cannabis, mezclar la solución acuosa con fenol saturado con agua y cloroformo, y colocar la muestra a través de una centrifuga para formar una fase acuosa superior y una fase orgánica inferior. En una realización, se agrega un agente desnaturizante, por ejemplo, tiocianato de guanidinio, para desnaturizar proteínas, lo que da como resultado la división de los ácidos nucleicos en la fase acuosa y la división de las proteínas en la fase orgánica. En una realización, el pH determina qué ácidos nucleicos se purifican y los ácidos nucleicos deseados se precipitan con un alcohol.

En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden la secuenciación de la información genética.

Como se usa en este documento, el término "secuenciar la información genética" se refiere a la determinación de la presencia, cantidad y/o orden de los nucleótidos y/o ácidos nucleicos en una muestra biológica. En una realización, la secuenciación del material genético facilita la capacidad de ver transcripciones de empalmes de genes alternativos, modificaciones postranscripcionales, fusión de genes, mutaciones/SNPs, y cambios en la expresión génica. En una realización, la secuenciación de la información genética determina la secuencia de ARN. Además de los transcritos de ARNm, el ARN de secuenciación puede proporcionar información sobre las poblaciones de ARN para incluir ARN total, ARN pequeño, como miARN, ARNt, ARNr y perfiles de ribosomas. En una realización, la secuenciación de la información genética determina la secuencia de ADN.

Como se usa en este documento, el término "identificar una diferencia" se refiere a

encontrar una variación en el material genético. Por ejemplo, identificar una diferencia entre una primera planta del género cannabis y una segunda planta del género cannabis. En una realización, identificar la diferencia comprende encontrar una secuencia génica codificante para una enzima entre una primera planta del género cannabis y una segunda planta del género cannabis. En una realización, identificar una diferencia comprende encontrar el material genético para el desarrollo del tricoma entre una primera planta del género cannabis y una segunda planta del género cannabis.

Como se usa en este documento, el término "homólogo" se refiere a diferentes versiones de material genético codificante para una característica de un ancestro común. En una realización, una primera planta del género cannabis y una segunda planta del género cannabis comparten un ancestro común, pero tienen genes diferentes. En una realización, una primera planta del género cannabis y una segunda planta del género cannabis comparten una secuencia génica ancestral común con diferencias de nivel de secuencia identificables.

Como se usa en este documento, el término "análogo" se refiere a diferentes versiones de material genético codificante para la misma función, pero con una ascendencia no-superpuesta. En una realización, una bacteria desarrolla una resistencia a un antibiótico a través de dos mecanismos genéticamente independientes en dos momentos independientes. Dentro del campo de la genética, la profunda homología ancestral y la transferencia horizontal de genes confunden la exactitud absoluta de cuándo usar un término y no el otro. Por lo tanto, dentro del contexto de esta divulgación, ambos términos son aceptables.

En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden comparar un transcriptoma ensamblado de la primera planta del género cannabis con un transcriptoma ensamblado de la segunda planta del género cannabis.

Como se usa en este documento, el término "transcriptoma" se refiere a la secuencia de ARN mensajero expresada en una célula o una población de células. En una realización, los genes asociados con la producción de compuestos secundarios son idénticos al transcriptoma ensamblado de la planta del género cannabis.

Como se usa en este documento, el término "transcriptoma ensamblado" significa recolectar datos sobre las secuencias de ARN utilizadas en la síntesis de proteínas dentro de una célula o una población de células. En una realización, si el ensamblaje fuera teóricamente perfecto, consistiría en todo el ARN presente en una muestra de tejido dada. En el contexto de esta divulgación, el transcriptoma puede consistir en una o más secuencias. Dentro del contexto de esta divulgación, el transcriptoma ensamblado para plantas cosechadas del género cannabis comprende de miles a millones de secciones de trozos, segmentos, o piezas de ARN. Además, estos pequeños fragmentos pueden hacer andamios y contigós más grandes de secuencias

genéticas.

Como se usa en este documento, el término "comparación de la abundancia de genes" se refiere a un análisis de la secuencia de ARN de la primera planta en relación con la secuencia de ARN de la segunda planta.

En una realización, la comparación de la abundancia de genes incluye la comparación del cambio de veces. En una realización, el cambio de veces se usa para medir el cambio en el nivel de expresión de los genes. En una realización, el cambio de veces se mide por RPKM.

Como se usa en este documento, el término "RPKM" se refiere a "Lecturas por Kilobase por Millón de Lecturas Mapeadas". El término RPKM se refiere a un método para cuantificar la expresión génica a partir de los datos de secuenciación de ARN mediante la normalización de la longitud total de lectura y el número de lecturas de secuenciación. En una realización, el cálculo de RPKM proporciona una normalización para comparar valores de cobertura de genes. El valor RPKM corrige las diferencias tanto en la profundidad de secuenciación de la muestra como en la longitud del gen.

En un ejemplo, el RPKM se puede calcular mediante la siguiente fórmula:

$$\text{numReads} / (\text{geneLength}/1000 * \text{totalNumReads}/1,000,000);$$

en donde, "numReads" se refiere al número de lecturas mapeadas a una secuencia de genes;

en donde, "geneLength" se refiere a la longitud de la secuencia del gen; y

en donde, "totalNumReads" se refiere al número total de lecturas mapeadas de una muestra.

Por ejemplo, los datos de cambio de veces de una muestra de CBG en comparación con una muestra de CBGV con fines puramente hipotéticos e ilustrativos podrían demostrar la siguiente relación:

gen A: 2x

gen B: 1x

gen C: 1000x

gen D: 1,3x

gen E: 100x

En el ejemplo ilustrativo anterior, el gen C sería más probable que explique la diferencia de fenotipo y el gen E el segundo más probable debido a la abundancia relativa de lecturas.

Los cálculos necesarios para realizar la comparación anterior se pueden realizar a través del software disponible en la técnica, como el Trinity workflow o una variedad de otros paquetes

similares.

RPKM es un método, otros métodos incluyen, pero no se limitan a, Fragmentos por Kilobase por Millón de lecturas mapeadas (FPKM) y Transcripciones por Kilobase Million (TPM).

En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden comparar una primera secuencia génica del transcriptoma ensamblado de la primera planta del género cannabis con una segunda secuencia génica del transcriptoma ensamblado de la segunda planta del género cannabis.

Como se usa en este documento, el término "comparar" se refiere al análisis de la primera secuencia de genes con la segunda secuencia de genes para determinar las diferencias y similitudes de los dos conjuntos de secuencias de genes.

En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden la identificación de al menos un gen que se expresa más dentro de la primera planta del género cannabis en comparación con la segunda planta del género cannabis.

Como se usa en este documento, el término "expresado más" significa un gen que está presente en el genoma de dos plantas y el gen en una planta está regulado para producir mayores unidades de proteínas funcionales o productos genéticos del gen en cuestión (también conocido como regulado hacia arriba) en comparación con el gen en la otra planta.

En una realización, el método descrito en este documento comprende la identificación de al menos un gen que se expresa menos en la primera planta del género cannabis en comparación con la segunda planta del género cannabis.

Como se usa en este documento, el término "expresado menos" significa un gen que está presente en el genoma de ambas plantas y el gen en una planta está regulado para producir menos unidades de proteínas funcionales o productos genéticos del gen en cuestión (también conocido como regulado hacia abajo) en comparación con el gen en la otra planta.

Como se usa en este documento, el término "regulado" significa modificar o afectar los mecanismos genéticos de la expresión de proteínas o ARN que dictan además la expresión de genes. En una realización, la expresión génica se regula mediante la introducción de promotores y/u otros elementos reguladores, tales como potenciadores y represores que aumentan la transcripción de proteínas. En una realización, la expresión génica se regula incrementando la traducción del ARNm.

En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden comparar un número expresado de una secuencia génica encontrada en A) el transcriptoma ensamblado de la primera planta del género cannabis y B) el transcriptoma ensamblado de la segunda planta del género cannabis.

Tal como se usa en este documento, el término "número expresado" se refiere al número

de veces que se transcribe un gen para producir ARNm y, en última instancia, para producir proteínas funcionales. En una realización, el número expresado puede determinar cuántas veces se expresa un gen de síntesis de cannabinoides.

Como se usa en este documento, el término "gen de síntesis de cannabinoides" se refiere a material genético que codifica una proteína y/o enzima involucrada en la producción de compuestos secundarios, por ejemplo, un cannabinoide o cannabinoides, que se encuentran en una planta del género cannabis.

En una realización, el gen de síntesis de cannabinoides codifica la CBCA sintasa. En una realización, el gen de síntesis de cannabinoides codifica la CBDA sintasa. En una realización, el gen de síntesis de cannabinoides codifica THCA sintasa. En una realización, el gen de síntesis de cannabinoides codifica la tetracétido sintasa. En una realización, el gen de síntesis de cannabinoides codifica la preniltransferasa aromática. En una realización, el gen de síntesis de cannabinoides codifica el ácido olivetólico ciclasa.

En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden la identificación del número expresado de un gen de expresión de la CBCA sintasa. En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden la identificación del número expresado de un gen de expresión de CBDA sintasa. En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden la identificación del número expresado de un gen de expresión de THCA sintasa. En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden la identificación del número expresado de un gen de expresión de preniltransferasa aromática. En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden la identificación del número expresado de un gen de expresión de tetracétido sintasa. En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden la identificación del número expresado de un gen de expresión de la ciclasa del ácido olivetólico.

En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden comparar una abundancia de copias de genes del transcriptoma ensamblado de la primera planta con una abundancia de copias de genes del transcriptoma ensamblado de la segunda planta.

En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden la identificación de al menos un gen expresado más en la primera planta del género cannabis en comparación con la segunda planta del género cannabis.

En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden la identificación de al menos un gen expresado menos en la primera planta del género cannabis en comparación con la segunda planta del género cannabis.

En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden la sobreexpresión de al menos un gen expresado menos en la primera planta del género cannabis

en comparación con la segunda planta del género cannabis.

En una realización, los métodos descritos en el presente documento comprenden subexpresar al menos un gen expresado menos en la primera planta del género cannabis en comparación con la segunda planta del género cannabis.

En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden la sobreexpresión de al menos un gen expresado más en la primera planta del género cannabis en comparación con la segunda planta del género cannabis.

En una realización, los métodos descritos en el presente documento comprenden subexpresar al menos un gen expresado más en la primera planta del género cannabis en comparación con la segunda planta del género cannabis.

En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden la sobreexpresión de al menos un gen expresado más en la primera planta del género cannabis en comparación con la segunda planta del género cannabis; y subexpresando al menos un gen expresado menos en la primera planta del género cannabis en comparación con la segunda planta del género cannabis.

En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden comparar un genoma de la primera planta del género cannabis con un genoma de la segunda planta del género cannabis.

En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden comparar el número de copias de una secuencia génica encontrada en A) el genoma de la primera planta del género cannabis y B) el genoma de la segunda planta del género cannabis.

Como se usa en este documento, el término "número de copia" se refiere a cuántas veces se repite una secuencia específica en el genoma. En una realización, la comparación de secuencias de ADN puede determinar qué planta tiene un número de copia más bajo de una secuencia que codifica la CBCA sintasa. En una realización, la comparación de secuencias de ADN puede determinar qué planta tiene un número de copia más bajo de una secuencia que codifica CBDA sintasa. En una realización, la comparación de secuencias de ADN puede determinar qué planta tiene un número de copia más bajo de una secuencia que codifica la sintasa THCA.

En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden comparar una abundancia de secuencias de genes del genoma ensamblado de la primera planta del género cannabis con una abundancia de secuencias de genes del genoma ensamblado de la segunda planta del género cannabis.

En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden la identificación de al menos un gen presente con más copias en el genoma de la primera planta del género

cannabis que en el genoma de la segunda planta del género cannabis.

En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden identificar al menos un gen presente con menos copias en el genoma de la primera planta del género cannabis que en el genoma de la segunda planta del género cannabis.

En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden la sobreexpresión de una secuencia génica presente en el material genético de la primera planta del género cannabis homóloga a una secuencia génica presente en el material genético de la segunda planta del género cannabis.

En una realización, los métodos descritos en el presente documento comprenden subexpresar una secuencia génica presente en el material genético de la primera planta del género cannabis homóloga a una secuencia génica presente en el material genético de la segunda planta del género cannabis.

En una realización, los métodos descritos en el presente documento comprenden subexpresar una secuencia génica presente en el material genético de la primera planta del género cannabis homóloga a una secuencia génica presente en el material genético de la segunda planta del género cannabis, y sobreexpresar una secuencia génica presente en el material genético de la primera planta del género cannabis homóloga a la secuencia de genes presente en el material genético de la segunda planta del género cannabis.

Tal como se usa en este documento, el término "sobreexpresar" se refiere a aumentar la actividad de un gen en una planta del género cannabis que resulta en la producción de más unidades funcionales de proteínas y/o productos génicos. En una realización, la sobreexpresión comprende introducir promotores, agregar genes, y/o inhibir los represores.

Tal como se usa en este documento, el término "subexpresar" se refiere a la disminución de la actividad del gen en una planta que da como resultado la producción de menos unidades funcionales de proteínas y/o productos genéticos. En una realización, la subexpresión comprende introducir represores, eliminar genes y/o promover genes responsables de la represión.

En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden una diferencia de una secuencia génica presente dentro del material genético de la primera planta del género cannabis homóloga a una secuencia génica presente dentro del material genético de la segunda planta del género cannabis, en donde la diferencia es una secuencia génica que codifica una enzima de síntesis de cannabinoides.

En una realización, la enzima de síntesis de cannabinoides se elige entre una sintasa de THCA, sintasa de CBCA, sintasa de CBDA, preniltransferasa aromática, ácido olivetólico ciclasa, o tetracétido sintasa.

En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden la

sobreexpresión de la secuencia génica que codifica una enzima de síntesis de cannabinoides. En una realización, los métodos descritos en el presente documento comprenden la sobreexpresión de la secuencia génica que codifica la preniltransferasa aromática. En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden la sobreexpresión de la secuencia génica que codifica la CBCA sintasa. En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden la sobreexpresión de la secuencia génica que codifica la CBDA sintasa. En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden la sobreexpresión de la secuencia génica que codifica la THCA sintasa. En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden la sobreexpresión de la secuencia génica que codifica el ácido olivetólico ciclasa. En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden la sobreexpresión de la secuencia génica que codifica la tetracétido sintasa.

En una realización, los métodos descritos en el presente documento comprenden subexpresar la secuencia génica que codifica una enzima de síntesis de cannabinoides. En una realización, los métodos descritos en el presente documento comprenden subexpresar la secuencia génica que codifica la preniltransferasa aromática. En una realización, los métodos descritos en el presente documento comprenden subexpresar la secuencia génica que codifica la CBCA sintasa. En una realización, los métodos descritos en el presente documento comprenden subexpresar la secuencia génica que codifica la CBDA sintasa. En una realización, los métodos descritos en el presente documento comprenden subexpresar la secuencia génica que codifica la THCA sintasa. En una realización, los métodos descritos en el presente documento comprenden subexpresar la secuencia génica que codifica el ácido olivetólico ciclasa. En una realización, los métodos descritos en el presente documento comprenden subexpresar la secuencia génica que codifica la tetracétido sintasa.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en este documento comprenden:

Construir una enzima endonucleasa dirigida a una secuencia de ácido nucleico que codifica enzimas de síntesis de cannabinoides;

Introducir la enzima endonucleasa en un genoma de una planta del género cannabis,
y

Manipular la expresión de las enzimas de síntesis de cannabinoides dentro del genoma.

Como se usa en este documento, el término "enzima endonucleasa" se refiere a una molécula capaz de escindir el enlace fosfodiéster dentro de una cadena de polinucleótido. En una realización, la enzima endonucleasa escinde enlaces fosfodiéster en una cadena de ADN. En una realización, la enzima endonucleasa escinde enlaces fosfodiéster en una cadena de ARN. En una realización, la enzima endonucleasa es un complejo CRISPR/Cas9. En una realización, la enzima

endonucleasa es una nucleasa de dedo de zinc.

Como se usa en este documento, el término "construir una enzima endonucleasa" se refiere a la creación de una molécula capaz de escindir el enlace fosfodiéster dentro de una cadena de polinucleótidos para la modificación genética. En una realización, construir una enzima endonucleasa está destinado a escindir genes del genoma. En una realización, la escisión da como resultado una mutación de la secuencia de ADN que la hace no funcional para codificar, por ejemplo, la producción de proteínas. En una realización, la construcción de una enzima endonucleasa incluye estructuras adicionales para ayudar en la escisión. En un ejemplo, se incorpora un ARN guía.

Como se usa en este documento, el término "escisión" significa romper un enlace químico, o enlaces, entre dos átomos, lo que resulta en la separación de los dos átomos. En el contexto de esta divulgación, la escisión abarca técnicas conocidas en la técnica y procesos naturales en un organismo. En un ejemplo, la escisión de enlaces comprende el catabolismo, rompiendo moléculas más grandes en subunidades más pequeñas por oxidación. En un ejemplo, escindir enlaces comprende hidrólisis.

Como se usa en este documento, el término "dirigirse a una secuencia de ácido nucleico" se refiere al diseño de una enzima endonucleasa para reconocer una secuencia específica de nucleótidos. Reconocer una secuencia específica de nucleótidos permite la edición de genes precisa, eficiente, y flexible, por ejemplo, guiando/dirigiendo una pequeña secuencia de ADN, dirigiendo genes específicos, etc. En una realización, la secuencia de ácido nucleico es una secuencia de ADN. En una realización, la secuencia de ácido nucleico es una secuencia de ARN.

En una realización, dirigir una secuencia de ácido nucleico comprende dirigir una enzima endonucleasa para reconocer una secuencia de ADN que codifica una enzima de síntesis de cannabinoides.

En una realización, dirigir una secuencia de ácido nucleico comprende dirigir una enzima endonucleasa para reconocer una secuencia de ADN que codifica CBCA sintasa. En una realización, dirigir una secuencia de ácido nucleico comprende dirigir una enzima endonucleasa para reconocer una secuencia de ADN que codifica CBDA sintasa. En una realización, dirigir una secuencia de ácido nucleico comprende dirigir una enzima endonucleasa para reconocer una secuencia de ADN que codifica THCA sintasa. En una realización, dirigir una secuencia de ácido nucleico comprende dirigir una enzima endonucleasa para reconocer una secuencia de ADN que codifica latetracétido sintasa. En una realización, dirigir una secuencia de ácido nucleico comprende dirigir una enzima endonucleasa para reconocer una secuencia de ADN que codifica preniltransferasa aromática. En una realización, dirigir una secuencia de ácido nucleico comprende dirigir una enzima endonucleasa para reconocer una secuencia de ADN que codifica

el ácido olivetólico ciclasa.

Como se usa en este documento, el término "introducir la enzima endonucleasa" se refiere a agregar la enzima endonucleasa a una planta del género cannabis. En una realización, la introducción de la enzima endonucleasa comprende utilizar técnicas in vivo a través de transgénicos. En una realización, la enzima endonucleasa se construye in vitro y es introducida en el genoma de una planta del género cannabis.

Como se usa en este documento, el término "in vivo" se refiere a un proceso o procesos biológico(s) dentro de un organismo vivo. En una realización, el término "in vivo" se refiere a transgénicos.

Como se usa en este documento, el término "transgénicos" es la introducción de genes fabricados en un organismo vivo. Los ejemplos de técnicas transgénicas incluyen, pero no se limitan a, biolísticos, transformación mediada por *Agrobacterium*, y transfección de protoplastos.

Como se usa en este documento, el término "in vitro" se refiere a procesos biológicos fuera de un organismo vivo. En una realización, la enzima endonucleasa se construye en un medio de cultivo artificial. En una realización, el medio de cultivo artificial es un tubo de ensayo. En una realización, el medio de cultivo artificial es una placa de Petri. En una realización, el medio de cultivo artificial es un matraz. En una realización, se fabrica una bacteria in vitro que comprende una secuencia génica que codifica una enzima endonucleasa.

En una realización, la enzima endonucleasa se fabrica in vitro. En una realización, la introducción de la enzima endonucleasa se realiza a través de la inoculación de la planta con una bacteria que comprende una secuencia génica para una enzima endonucleasa.

Una vez inoculadas, las bacterias producen células vegetales que producirán la enzima endonucleasa. En una realización, la inoculación comprende colocar la planta en una cámara de vacío con una solución bacteriana que comprende la enzima endonucleasa y eliminar el aire extrayendo la solución bacteriana que comprende la enzima endonucleasa en el plan. En una realización, la inoculación comprende rociar la planta con una enzima endonucleasa. En una realización, "rociar" incluye el bombardeo de partículas biolísticas.

En una realización, la enzima endonucleasa es un sistema CRISPR/Cas9.

Como se usa en este documento, el término "CRISPR" se refiere a un acrónimo que significa Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas de secuencias de ADN. CRISPR es una serie de secuencias de ADN repetidas con secuencias de ADN únicas entre las repeticiones. El ARN transcrito de las cadenas únicas de ADN sirve como guía para dirigir la escisión. CRISPR se usa como una herramienta de edición de genes. En una realización, CRISPR se usa junto con una proteína Cas9.

Como se usa en este documento, el término "Cas" se refiere a proteínas asociadas a

CRISPR que actúan como enzimas que cortan el genoma en secuencias específicas. Cas9 se refiere a un grupo específico de proteínas conocido en la técnica. Las secuencias de ARN elaboradas a partir de las enzimas Cas9 directas de CRISPR para cortar ciertas secuencias encontradas en el genoma. Otras clases de Cas también son aceptables. En una realización, el sistema CRISPR/Cas9 escinde una o dos cadenas cromosómicas en los dominios de proteína Cas9 conocidos. En una realización, una de las dos cadenas cromosómicas está mutada. En una realización, dos de las dos cadenas cromosómicas están mutadas.

Como se usa en este documento, el término "cadena cromosómica" se refiere a una secuencia de ADN dentro del cromosoma. Cuando el sistema CRISPR/Cas9 escinde las cadenas cromosómicas, las cadenas se cortan, dejando la posibilidad de que una o dos cadenas sean mutadas, ya sea la cadena plantilla o la cadena codificante.

Como se usa en este documento, el término "cadena plantilla de ADN" se refiere a la secuencia de ADN utilizada para sintetizar ARNm. En una realización, la cadena plantilla de ADN codifica un gen para una enzima de síntesis de cannabinoides. En una realización, la enzima de síntesis de cannabinoides es elegida entre THCA sintasa, CBCA sintasa, CBDA sintasa, tetracétido sintasa, preniltransferasa aromática, o preniltransferasa aromática.

Como se usa en este documento, el término "cadena codificante de ADN" se refiere a la secuencia de ADN que corresponde a los codones, que finalmente se traducen en proteínas. En una realización, la cadena codificante de ADN codifica un gen para una enzima de síntesis de cannabinoides. En una realización, la enzima de síntesis de cannabinoides se elige entre THCA sintasa, CBCA sintasa, CBDA sintasa, tetracétido sintasa, preniltransferasa aromática, o preniltransferasa aromática.

En una realización, cualquier cadena de ADN cromosómico podría ser la "cadena codificante" o la "cadena plantilla". En una realización, la estructura inherente de la cadena de ADN es relevante para determinar qué cadena es la cadena codificante y qué cadena es la cadena plantilla.

Como se usa en este documento, el término "mutado" significa cambiar un nucleótido o nucleótidos en una secuencia génica que causa un cambio en la secuencia génica de ocurrencia natural. El cambio en la secuencia génica a su vez afecta la función prevista de una proteína o enzima elaborada a partir de la secuencia genética. Los métodos alternativos de corte o mutación del ADN incluyen TALENS, nucleasas de dedos de zinc, etc.

En una realización, el sistema CRISPR/Cas9 escinde ambas cadenas induciendo la unión del extremo no homólogo (NHEJ) y luego una inserción/eliminación (INDEL) que causa que la proteína mute y se convierta en no-funcional. En una realización, la no-funcionalidad resulta de una mutación sin sentido que causa un codón stop prematuro.

En una realización, el sistema CRISPR/Cas9 escinde ambas cadenas causando que se produzca una reparación dirigida por homología (HDR). En una realización, una cadena donante de ADN se inserta en el espacio entre las cadenas escindidas evitando la mutación aleatoria. En una realización, la cadena donante de ADN es una secuencia de ADN que codifica la preniltransferasa aromática. En una realización, la cadena donante es una secuencia de ADN no codificante.

En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden insertar una cadena donante de ADN en el genoma de la planta del género cannabis.

En una realización, la cadena donante de ADN es una secuencia génica que codifica la preniltransferasa aromática.

Como se usa en este documento, el término "cadena donante de ADN" se refiere a material genético insertado en el genoma, una cadena de ADN, un gen, etc. La cadena donante de ADN puede ser codificante o no codificante. En una realización, una cadena donante de ADN se inserta en los sitios de corte del ADN para evitar que se produzcan mutaciones por la reparación del ADN. En una realización, una cadena donante de ADN se inserta en los sitios de corte del ADN para inducir mutación.

En una realización, los métodos descritos en el presente documento comprenden un ARN guía.

Como se usa en este documento, el término "ARN guía" se refiere a una cadena de ARN que reconoce una secuencia específica de material genético y dirige dónde corta la enzima endonucleasa.

En una realización, el ARN guía dirige la enzima endonucleasa para escindir las cadenas cromosómicas codificantes para una enzima de síntesis de cannabinoides.

En una realización, el ARN guía dirige el sistema CRISPR/Cas9 para escindir las cadenas cromosómicas codificantes para una enzima de síntesis de cannabinoides.

En una realización, el ARN guía dirige el sistema CRISPR/Cas9 para dirigirse a un gen de expresión de CBDA sintasa. En una realización, el ARN guía dirige el sistema CRISPR/Cas9 para dirigirse a un gen de expresión de la CBCA sintasa. En una realización, el ARN guía dirige el sistema CRISPR/Cas9 para dirigirse a un gen de expresión de THCA sintasa. En una realización, el ARN guía dirige el sistema CRISPR/Cas9 a un gen de expresión de la ciclase del ácido olivetólico. En una realización, el ARN guía dirige el sistema CRISPR/Cas9 para dirigirse a un gen de expresión de la tetracétido sintasa.

En el contexto de esta divulgación, otros ejemplos de enzimas endonucleasas incluyen SpCas9 de *Streptococcus pyrogenes* y otros. Además, SpCas9 tiene diferentes secuencias de Motivo Adyacente Protospacer (PAM) de NGG, lo que puede ofrecer otras ventajas. En un

ejemplo, un SpCas9 tiene una secuencia codificante más pequeña.

Otros ejemplos de proteínas que funcionan con CRISPRs o guías de ARN incluyen Cpf1, que puede usarse para cortar cadenas de ADN con terminaciones sobresalientes en lugar de terminaciones romas, o C2c2 para cortar ARN con un ARN guía.

Como se usa en este documento, el término "PAM" se refiere a una secuencia corta de pares de bases de ADN inmediatamente después de la secuencia de ADN dirigida por una enzima endonucleasa. En una realización, la enzima endonucleasa es un sistema CRISPR/Cas9.

Como se usa en este documento, el término "NGG" significa una secuencia de 3 nucleobases con una variable seguida de dos G. "N" significa cualquier nucleobase, mientras que "G" significa nucleobases de guanina.

En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden una enzima endonucleasa y un ARN guía. En una realización, los métodos descritos en el presente documento comprenden un ARN guía transcrito in vitro. En una realización, los métodos descritos en el presente documento comprenden un ARN guía transcrito in vivo.

En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden la introducción de una enzima Cas9 y un casete de expresión de ARN guía en el genoma.

En una realización, el sistema CRISPR/Cas9 escinde una secuencia de un gen de expresión de THCA sintasa funcional. En una realización, el sistema CRISPR/Cas9 escinde una secuencia de un gen de expresión de la CBDA sintasa funcional. En una realización, el sistema CRISPR/Cas9 escinde una secuencia de un gen de expresión de la CBCA sintasa funcional. En una realización, el sistema CRISPR/Cas9 escinde una secuencia de un gen funcional de expresión de tetracétido sintasa. En una realización, el sistema CRISPR/Cas9 escinde una secuencia de un gen funcional de expresión de la ciclase del ácido olivetólico.

En el contexto de esta divulgación, escindir una secuencia de un gen funcional provoca una mutación, cambio de secuencia, reorganización, etc., destruyendo o cambiando la funcionalidad de una enzima o proteína expresada a partir del gen.

En una realización, los métodos descritos en el presente documento comprenden manipular la expresión de enzimas dentro del genoma al interferir con la expresión de los genes de síntesis de cannabinoides.

Como se usa en este documento, el término "interferir con la expresión" significa obstaculizar la capacidad del genoma para expresar productos génicos funcionales. En una realización, la interferencia con la expresión se realiza mediante reducción (knockdown). En una realización, la interferencia con la expresión se realiza mediante eliminación (knockout).

Como se usa en este documento, el término "eliminación" ("knockout") se refiere a un proceso de prevención funcional de genes codificante para enzimas, proteínas, moléculas, y/o

compuestos. En una realización, la eliminación comprende un gen para no codificar una enzima. En una realización, un gen que codifica una enzima de síntesis de cannabinoides se corta funcionalmente, por ejemplo, mutación, cambio de secuencia, etc. En una realización, un gen que codifica una enzima de síntesis de cannabinoides se elimina de una cadena de ADN.

Como se usa en este documento, el término "reducción" ("knockdown") se refiere a un proceso de interferencia con la transcripción, post-transcripción, pre-traducción, traducción, etc., de información genética en enzimas, proteínas, moléculas, o compuestos. En una realización, la reducción comprende la interferencia con la información genética involucrada en la biosíntesis de los cannabinoides, por ejemplo, los genes codificantes para una enzima de síntesis de cannabinoides.

En una realización, los métodos descritos en el presente documento comprenden interferir con la expresión a través de ARNi.

Como se usa en este documento, el término "ARNi" se refiere a la interferencia de ARN. El ARNi es un método de silenciamiento de genes al interferir con el ARN mensajero, también conocido como ARNm. En una realización, las moléculas miARN (microARN) y siARN (pequeño ARN interferente) se unen a secuencias específicas de ARNm, degradando el ARNm y evitando la traducción de ciertas proteínas o enzimas. Los complejos de silenciamiento inducidos por ARN (RISC) comprenden una proteína argonauta (un tipo de enzima endonucleasa), que escinde el ARNm dirigido.

En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden interferir con la expresión de la enzima de síntesis de cannabinoides. En una realización, la enzima de síntesis de cannabinoides es CBCA sintasa. En una realización, la enzima de síntesis de cannabinoides es CBDA sintasa. En una realización, la enzima de síntesis de cannabinoides es THCA sintasa. En una realización, la enzima de síntesis de cannabinoides es tetraacetido sintasa. En una realización, la enzima de síntesis de cannabinoides es el ácido olivetólico ciclasa. En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden la introducción de copias adicionales de enzimas de síntesis de cannabinoides.

Como se usa en este documento, el término "introducir copias adicionales" significa agregar más genes codificantes para copias particulares de enzimas dentro de la planta del género cannabis. En una realización, la introducción de copias adicionales comprende la inoculación de una planta del género cannabis con un complejo CRISPR/Cas9.

En una realización, se introducen copias adicionales de un gen de síntesis de cannabinoides en una planta del género cannabis. En una realización, se introducen copias adicionales de un gen de síntesis de cannabinoides en el genoma de la planta. En una realización, el gen de síntesis de cannabinoides codifica la preniltransferasa aromática. En una realización,

los métodos descritos en este documento comprenden una disponibilidad creciente de sustratos precursores.

Como se usa en este documento, el término "sustrato precursor" se refiere a un compuesto utilizado para reacciones y procesos posteriores para producir otros compuestos. En una realización, CBGVA es un sustrato precursor. En una realización, CBGVA se convierte para formar CBGV. En otras realizaciones, CBGVA se convierte en THCVA, CBDVA y/o CBCVA. En otras realizaciones, THCVA, CBDVA y CBCVA se usan como sustratos precursores para reacciones y procesos posteriores.

En el contexto de esta divulgación, un sustrato precursor puede referirse a cualquiera o todas las enzimas y/o proteínas involucradas en la biosíntesis de los cannabinoides. En una realización, la preniltransferasa aromática es un sustrato precursor.

Como se usa en este documento, el término "disponibilidad creciente de sustratos precursores" se refiere a permitir que más sustratos precursores reaccionen en reacciones subsiguientes para crear otras moléculas y/o compuestos. En una realización, el sustrato precursor es CBGVA. En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden descarboxilación de CBGVA. En una realización, los métodos descritos en el presente documento comprenden la descarboxilación de CBGVA para formar CBGV. En una realización, el sustrato precursor es CBGA. En una realización, los métodos descritos en el presente documento comprenden descarboxilación de CBGA. En una realización, los métodos descritos en este documento comprenden la descarboxilación de CBGA para formar CBG.

En una realización, la descarboxilación comprende calor. En una realización, la descarboxilación comprende luz.

En el presente documento se describen plantas producidas por los métodos descritos en este documento. En una realización, las plantas descritas en el presente documento producen proporciones no naturales de cannabinoides. En una realización, las plantas descritas en el presente documento producen concentraciones no naturales de cannabinoides.

En una realización, una planta se produce mediante el método de control de la síntesis de un primer cannabinoide en una planta del género cannabis que comprende:

manipular la expresión de un gen que codifica una enzima de síntesis de cannabinoides.

En una realización, una planta se produce mediante el método de:

seleccionar una primera planta del género cannabis;

seleccionar una segunda planta del género cannabis, en donde la primera planta del género cannabis produce un primer cannabinoide más que la segunda planta del género cannabis;

recolectar material genético de la primera planta del género cannabis;
recolectar material genético de la segunda planta del género cannabis;
comparar el material genético de la primera planta del género cannabis con el material genético de la segunda planta del género cannabis; e

identificar una diferencia en una secuencia de genes presente dentro del material genético de la primera planta del género cannabis homóloga a una secuencia de genes presente dentro del material genético de la segunda planta del género cannabis.

En una realización, una planta se produce mediante el método de:

construir una enzima endonucleasa dirigida a una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima de síntesis de cannabinoides;

introducir la enzima endonucleasa en un genoma de la planta del género cannabis; y
manipular la expresión de la enzima de síntesis de cannabinoides dentro del genoma.

En una realización, una planta se produce mediante el método de:

manipular la expresión de un gen que codifica una enzima de síntesis de cannabinoides; que comprende:

seleccionar una primera planta del género cannabis;

seleccionar una segunda planta del género cannabis, en donde la primera planta del género cannabis produce un primer cannabinoide más que la segunda planta del género cannabis;

recolectar material genético de la primera planta del género cannabis;

recolectar material genético de la segunda planta del género cannabis;

comparar el material genético de la primera planta del género cannabis con el material genético de la segunda planta del género cannabis; e

identificar una diferencia en una secuencia de genes presente dentro del material genético de la primera planta del género cannabis homóloga a una secuencia de genes presente dentro del material genético de la segunda planta del género cannabis, y que comprende además:

construir una enzima endonucleasa dirigida a la secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima de síntesis de cannabinoides;

introducir la enzima endonucleasa en un genoma de la planta del género cannabis; y
manipular la expresión de la enzima de síntesis de cannabinoides dentro del genoma.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Consideraciones generales para la síntesis controlada de un cannabinoide en plantas *Cannabis sp.* se realizaron a través de una vía multi-ramificada. Los procesos enzimáticos son

responsables de cada una de las ramas individuales. Si la planta solo produce un subconjunto de estas enzimas o productos genéticos, la presente vía multi-ramificada puede especificarse para un único producto de síntesis preferido.

Ejemplo 2

En este documento se describe un ejemplo ilustrativo de la mejora de la producción de CBGA como el único cannabinoide de interés dentro de una planta del género cannabis. La síntesis de CBGA en plantas de *Cannabis sp.* tiene lugar en un paso intermedio en el proceso de síntesis de THCA, CBDA, y/o CBCA. El CBGA sirve específicamente como sustrato que es utilizado por enzimas de síntesis de cannabinoides específicos, por ejemplo, THCA-sintasa, CBDA-sintasa, y CBCA-sintasa. Estas enzimas son eficientes para convertir CBGA en productos terminales. Por lo tanto, el CBGA nunca está presente en abundancia cuando estas enzimas están presentes

Para mejorar la producción de CBGA, se utilizaron técnicas de edición genómica para reducir/eliminar la cantidad de enzimas funcionales de síntesis de cannabinoides producidas dentro de la planta. Se realizó una alineación utilizando secuencias de ARNm para THCA sintasa, CBDA sintasa, y CBCA sintasa para encontrar una secuencia diana CRISPR. Estos genes comparten cantidades significativas de homología de secuencia, lo que significa que una alineación bien hecha puede cortar los genes que producen estas enzimas simultáneamente.

Cuando se identificó el sitio de homología de secuencia, se diseñó un casete de expresión de ARN *in silico* y se desarrolló como un constructo de ADNds sintético. El constructo de expresión de ARN consistió en un promotor constitutivo de Pol III (*Arabidopsis thaliana* U6) que conduce la expresión de una molécula de ARNsg que contiene el objetivo de interés.

El constructo de ADNds sintético se ligó en un plásmido de vector de transfección de plantas *Agrobacterium* que contiene un segundo casete de expresión. El segundo casete de expresión confiere la expresión de una versión optimizada de codón eucariótico de la proteína SpCas9. La expresión de SpCas9 se realiza a través de un promotor CaMV35s constitutivamente activo.

El plásmido ligado que contenía ambos casetes de expresión se transformó en *E. coli* y se colocó en placas.

Se aislaron colonias individuales y se cultivaron para su posterior extracción a través de la minipreparación del plásmido de ADN. El plásmido aislado de este procedimiento se verificó mediante secuenciación, PCR, y electroforesis en gel. Se aisló una muestra de plásmido único y se verificó. El plásmido se transformó en *Agrobacterium tumefaciens*. Se aislaron colonias individuales. La cepa *Agrobacterium* alberga un plásmido de Ti desarmado que confiere la función de virulencia durante la transfección de plantas mediada por *Agrobacterium*. La selección de ambos plásmidos se realizó con dos antibióticos, uno relevante para cada plásmido. Las colonias

se seleccionaron doblemente de esta manera se hicieron crecer a las cantidades requeridas para la inoculación de la planta con tratamiento antibiótico dual en medio LB.

Ejemplo 3

En el presente documento se describe un ejemplo ilustrativo de inoculación a pequeña escala con una bacteria o un vector elaborado por el tratamiento antibiótico dual realizado en el Ejemplo 2.

Las células de *Agrobacterium* se recogieron de las placas mediante raspado y se suspendieron en medios de inoculación. Las células se resuspendieron a una densidad objetivo de 0,02-0,5 OD₆₀₀. El fluido de inoculación consistió en 1/4 medio de planta MS, 1/2 sales AB (K₂HPO₄ 17 mM, 8,3 mM NaH₂PO₄, NH₄Cl 18,7 mM, KCl 2 mM), sacarosa al 0,3%, y MES 50 mM, Acetosringona 200 µM a un pH de aproximadamente 5,5. Las células se cultivaron en esta mezcla de inoculación durante 2-6 horas a temperatura ambiente antes de la inoculación de la planta.

Recortes o clones recién enraizados de *Cannabis sativa* se sumergieron boca abajo en la mezcla de inoculación de *Agrobacterium* y se colocaron en una cámara de vacío. Se aplicó un ligero vacío de -5 Hg a las plantas sumergidas durante 30 segundos y el vacío se liberó lentamente. Las plantas tratadas fueron enraizadas a través de la hormona de enraizamiento o simplemente crecían si ya estaban enraizadas. Las plantas adultas se puntuaron por composición química semanas más tarde.

Las plantas que resultaron de estos procesos fueron pensadas para actuar como plantas de producción y también como material de propagación vegetativa para los ciclos de crecimiento posteriores.

Ejemplo 4

En el presente documento se describe un ejemplo ilustrativo de la inoculación a gran escala con una bacteria o un vector elaborado por el tratamiento antibiótico dual realizado en el Ejemplo 2.

Cantidades adecuadas de células de *Agrobacterium* transformadas se cultivaron en placas y se recolectaron mediante raspado para producir 30 L de fluido de inoculación a una densidad de 0,02-0,1 OD₆₀₀. El fluido de inoculación consistió en agua desionizada con un pH ajustado de 5,5. Los pisos de vivero con 60-70 plantas cada uno se apoyaron a través de una rejilla metálica magnética en una cámara de vacío de acero conteniendo el fluido de inoculación. Los dos tercios superiores de cada planta se sumergieron en el fluido de inoculación. Se aplicó un vacío (-5 en Hg durante 30 segundos) a la cámara. Las plantas se retiraron de la cámara de vacío y se cultivaron en invernaderos durante 1-2 semanas antes de plantar afuera en un campo comercial. Se realizó un análisis químico en estas plantas para evaluar la efectividad del tratamiento.

Las plantas que resultaron de estos procesos fueron pensadas para actuar como plantas de producción y también como material de propagación vegetativa para los ciclos de crecimiento posteriores.

Ejemplo 5

En este documento se describe un ejemplo ilustrativo de la modularidad del protocolo de mejora. Los ejemplos anteriores proporcionan métodos para mejorar la producción de CBGA en plantas de *Cannabis*. La misma metodología con un sitio de corte CRISPR diferente, eliminación de gen alternativo, o un procedimiento de reducción, puede dar como resultado un aumento de cualquier cannabinoide de interés.

Por ejemplo: reducir solo CBDA-sintasa resultaría en más producción de THCA y CBCA, al igual que reducir solo THCA-sintasa produce más CBDA y CBCA, y reducir THCA-sintasa y CBD-sintasa al mismo tiempo aumentaría los niveles de CBCA y CBGA que se producen. Finalmente, dirigiéndose a otros pasos en la ruta de síntesis, como los genes responsables de los pasos de prenilación, ciclación o síntesis de policétidos; se pueden especificar muchos otros cannabinoides para la producción mejorada, como THCVA, CBDVA, CBCVA, CBGVA, etc.

Los ejemplos ilustrativos anteriores para el aumento de CBGA se usan para demostrar un método general que puede aplicarse para mejorar la producción de cannabinoides para otros cannabinoides descritos en el presente documento en plantas del género cannabis.

Ejemplo 6

En este documento se describe un ejemplo ilustrativo del cultivo de plantas del género cannabis con una mayor producción de CBD.

Se creó una colección de plantas (60,000) dirigida a la producción mejorada de CBD utilizando la metodología descrita anteriormente en el Ejemplo 4. Las plantas mejoradas (es decir, modificadas) del género cannabis se cultivaron en una granja de cáñamo de 200 acres en el área del este de Colorado, donde se dispersaron uniformemente dentro de una colección de plantas naturales no mejoradas (control), con todas las plantas expuestas a condiciones de crecimiento idénticas.

Para evaluar las diferencias entre las plantas mejoradas y las plantas de control, los cortes de los brotes superiores de las plantas se tomaron al azar de 16 plantas mejoradas, que se dispersaron uniformemente en la granja de cáñamo. Los niveles de CBD se midieron para estas plantas mejoradas extrayendo los esquejes de plantas con isopropanol, filtrando el material vegetal insoluble, y analizando el extracto a través de SFC analítica.

Los resultados mostraron que la producción de CBD en las plantas mejoradas se duplicó aproximadamente con respecto a la producción de CBD en las plantas de control no mejoradas, mientras que la potencia total de las plantas mejoradas se mantuvo sin cambios.

Ejemplo 7

En este documento se describe un ejemplo ilustrativo del cultivo de plantas del género cannabis con una mayor producción de CBG.

Se creó una colección de plantas (30,000 - 40,000) dirigida a la producción mejorada de CBG utilizando la metodología descrita anteriormente en el Ejemplo 4. Las plantas mejoradas (es decir, modificadas) se cultivaron en una granja de cáñamo de 30 acres en el área del este de Colorado, donde se dispersaron uniformemente dentro de una colección de plantas naturales no mejoradas (control), con todas las plantas expuestas a condiciones de crecimiento idénticas.

Para evaluar las diferencias entre las plantas mejoradas y las plantas de control, los cortes de los brotes superiores de las plantas se tomaron al azar de 16 plantas mejoradas, que se dispersaron uniformemente en la granja de cáñamo. Los niveles de CBG se midieron para estas plantas mejoradas extrayendo los esquejes de plantas con isopropanol, filtrando el material vegetal insoluble, y analizando el extracto a través de SFC analítica.

Los resultados mostraron que la producción de CBG en las plantas mejoradas del género cannabis se duplicó aproximadamente en comparación con la producción de CBG en las plantas de control no mejoradas del género cannabis, mientras que la potencia total de las plantas mejoradas se mantuvo sin cambios.

Ejemplo 8

En el presente documento se describe un ejemplo ilustrativo de corte CRISPR doble de THCA sintasa y CBDA sintasa a través de la homología para la inserción en un vector, denominado vector "Ebbu".

A continuación, se muestra un ejemplo ilustrativo del diseño de una molécula de sgARN para cortar tanto la secuencia codificante de la THCA como la de la CBDA sintasa. Se usó un único corte basado en altos niveles de homología entre los genes. La posición estaba en 452 pb en orientación de complemento inversa, al final de la secuencia de PAM del codón de inicio en función de la alineación de trabajo actual de las sintasas THCA y CBDA.

Grab original del sitio aln. para RevComp. (CCN)

GCCGGAGCTA CCCTTGGAGA AGTTTATTAT TGGG (SEQ ID NO: 1)

Anotación anterior:

PAMrc: CCG; GAGCTACCCTTGGAGAAGTT TATTATTGGG (SEQ ID NO: 2)

SumRevC: CCGGAGCTACCCTTGGAGAAGTT (SEQ ID NO: 3)

SumInCutOrient: AACTTCTCCAAGGGTAGCTCCGG (SEQ ID NO: 4)

Anotación de orientación correcta: ARNg PAM

AACTTCTCCAAGGGTAGCTC CGG (SEQ ID NO:4)

La siguiente secuencia fue agregada al casete CRISPR:

AACTTCTCCAAGGGTAGCTC (SEQ ID NO:5)

NCBI BLAST OK/No: Sí, no hay otros genes con homología.

Secuencia de ensamblaje:

CACAATTCCACACAACATACGAGCCCTTTTTTCTTCTTCTTCGTTTCATACAGTTTTTT
TTTGTATCAGCTTACATTTTCTTGAACCGTAGCTTCGTTTTCTTCTTTTACTTTC
CATTCGGAGTTTTTGTATCTTGTTCATAGTTTGTCCCAGGATTAGAATGATTAGGCA
TCGAACCTTCAAGAATTTGATTGAATAAAACATCTTCATTCTTAAGATATGAAGATAAT
CTTCAAAAGGCCCTGGGAATCTGAAAGAAGAGAAGCAGGCCCATTTATATGGGAA
AGAACAATAGTATTTCTTATATAGGCCCATTTAAGTTGAAAACAATCTTCAAAAGTCC
CACATCGCTTAGATAAGAAAACGAAGCTGAGTTTATATACAGCTAGAGTCGAAGTAG
TGATTGAACTTCTCCAAGGGTAGCTCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAA
GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTCTAGAC
CCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGCATTAAAGCGGAGAATTAAGGGAGTCACG (SEQ ID NO:6)

Aunque la presente invención en el presente documento se ha descrito con referencia a diversas realizaciones ejemplares, debe entenderse que estas realizaciones son meramente ilustrativas de los principios y aplicaciones de la presente invención. Los expertos en la técnica reconocerán que pueden realizarse diversas modificaciones a las realizaciones ejemplares, sin apartarse del alcance de la invención.

Además, debe entenderse que varios atributos y/o características de diferentes realizaciones en el presente documento pueden combinarse entre sí. Por lo tanto, debe entenderse que pueden realizarse numerosas modificaciones a las realizaciones ilustrativas y que pueden diseñarse otras disposiciones sin apartarse del alcance de la invención.

Además, otras realizaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la consideración de la memoria descriptiva y la práctica de la invención descrita en el presente documento. Se pretende que la memoria descriptiva y los ejemplos se consideren solo a modo de ejemplo, con un alcance y un espíritu indicados en las reivindicaciones.

Finalmente, se señala 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 expresas e inequívocamente limitadas a un referente, y viceversa. Como se usa en este documento, el término "incluir" o "comprende" y sus variantes gramaticales están destinadas a ser no limitativas, de modo que la recitación de un artículo o artículos no es una exclusión de otros artículos similares que pueden ser sustituidos o agregados a los artículos citados.