

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Scienze del Farmaco

Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse naturali e Ambiente

Corso di laurea in Scienze Farmaceutiche Applicate

TESI DI LAUREA

Stabilizzazione di genotipi di *Cannabis sativa* L.

Relatore

Prof. Stefano Bona

Correlatrice

Dott.ssa Maddalena Cappello Fusaro

Laureando: Matteo Guernieri

Matricola: 1197783

Anno Accademico 2021/2022

INDICE

Introduzione.....	p.1
1. Caratterizzazione botanica.....	p.3
2. Caratterizzazione sistematica.....	p.5
2.1 <i>Caratterizzazione sistematica formale.....</i>	p.5
2.1.1 <i>Cannabis sativa.....</i>	p.5
2.1.2 <i>Cannabis indica.....</i>	p.5
2.1.3 <i>Cannabis ruderalis.....</i>	p.6
2.2 <i>“Indica” e “Sativa” nella nomenclatura volgare.....</i>	p.7
2.3 <i>Nuove tecniche per stabilire la corretta caratterizzazione tassonomica.....</i>	p.8
3. Principali metaboliti del genere <i>Cannabis</i>.....	p.10
3.1 <i>Fitocannabinoidi e biosintesi.....</i>	p.10
3.1.1 <i>Ereditarietà genetica dei fitocannabinoidi.....</i>	p.11
3.2 <i>Olio essenziale.....</i>	p.13
4. Tecniche di breeding.....	p.15
4.1 <i>Differenziazione e reversione sessuale in Cannabis Sativa.....</i>	p.15
4.2 <i>Inbreeding e vigore ibrido.....</i>	p.17
4.3 <i>Esempio di ibrido in Cannabis Sativa: “Skunk No.1”.....</i>	p.19
Conclusioni.....	p.21
Bibliografia.....	p.22

Abstract

In questa trattazione è stato svolto un confronto tra le tassonomie formali applicate a piante del genere *Cannabis*, per poi confrontarle con la nomenclatura volgare e recenti studi di genetica volti a determinare se esiste più di una specie nel genere. È stato inoltre approfondito il tema dell'olio essenziale, dei cannabinoidi e la loro ereditarietà genetica; è stata poi offerta una panoramica sui principali metodi di stabilizzazione del genotipo, passando attraverso tecniche tra cui il *selfing* e il *full-sibling*, volte ad aumentare l'omozigosi per selezionare poi i fenotipi con caratteristiche migliori.

In this discussion, a comparison between the formal taxonomies applied to *Cannabis* genus plants was made and then compared with the vulgar nomenclature and recent genetic studies aimed at determining whether there is more than one species in the genus. Essential oil, cannabinoids and their inheritance was also studied; an overview of the main methods of stabilization of the genotype was then offered, passing through techniques including *selfing* and *full-sibling*, with the purpose of increasing homozygosity and then selecting the phenotypes with the best characteristics.

Introduzione

La *Cannabis* (*Cannabis sativa* L.) è una specie erbacea annuale che è stata coltivata e diffusa dall'uomo in quasi tutte le parti del mondo, dai tropici alle pendici alpine. È una delle più antiche fonti vegetali utilizzata per produrre alimenti come olio e farina derivati dai semi; fibra tessile, resina che grazie ai suoi principi attivi viene utilizzata come medicinale ma anche come stupefacente (Kriese et al. 2004; Zuardi 2006). Diverse prove archeologiche indicano che la coltivazione della *Cannabis* ebbe origine in Cina, dove venne impiegata per la sua fibra e dall'inizio del XVI secolo si diffuse in Medio Oriente, Europa e Sud America (Nelson 1996; Schultes et al. 1974). Rimane comunque difficile individuare la distribuzione geografica originaria poiché questa specie è stata diffusa e modificata dall'uomo per migliaia di anni.

I primi riferimenti alla *Cannabis* e all'impiego in ambito medico risalgono al VI secolo a.C., ma è a partire dal del XIX secolo che fu introdotta in Europa occidentale come medicinale per trattare l'epilessia, i reumatismi, l'emigrania, l'asma e insonnia.

Oggi, in Italia, la *Cannabis* contenente più dello 0,5% di Tetraidrocannabinolo (THC) è considerata a livello legale uno stupefacente e pertanto è inserita nella Tabella II del D.p.R 309/1990 che ne vieta la coltivazione senza apposita autorizzazione del ministero della salute. Viene comunque utilizzata in ambito terapeutico: dal 2006 il medico può prescrivere preparati magistrali a base di *Cannabis*, che deve essere importata o prodotta dal 2016 dallo *Stabilimento Chimico Farmaceutico Militare* di Firenze. Inoltre dal 2007 è possibile importare medicinali contenenti cannabinoidi come Bedrocan, Bediol, Sativex. Con l'approvazione della legge n°242/2016, recante disposizioni per la promozione della coltivazione e della filiera agroindustriale della canapa, c'è stato un rinnovato interesse per la *Cannabis* in quanto la coltivazione della stessa ora è possibile senza nessuna autorizzazione, purché vengano coltivate solo varietà registrate e autorizzate e la percentuale di THC non superi lo 0,2%. Ciò ha dato un forte slancio alla ricerca verso lo sviluppo di nuove varietà. La seguente trattazione si occuperà quindi di approfondire alcune tecniche adottate per la stabilizzazione del genotipo, fattore fondamentale per lo sviluppo di una nuova varietà, che risulta stabile se conforme alla descrizione dei suoi caratteri essenziali a seguito di riproduzioni successive, mantenendo quindi l'omogeneità del fenotipo.

La coltivazione della *Cannabis* in tale campo può essere effettuata in tre metodi: indoor, in serra e outdoor.

La coltivazione indoor, gode di condizioni ambientali controllate, permettendo di agire direttamente su fotoperiodo, temperatura, umidità, quantità d'acqua e nutrienti. La pianta si troverà quindi nelle migliori condizioni possibili per poter esprimere al meglio il suo potenziale; inoltre, potendo isolare le singole piante all'interno di box quando devono essere impollinate, riduce al minimo il rischio di inquinamento con polline estraneo. Tuttavia questo metodo di coltivazione è molto oneroso a causa degli alti costi delle attrezzature e dell'energia utilizzata.

La coltivazione in serra di *C. sativa* avviene al riparo dalle intemperie atmosferiche, potendo intervenire principalmente sul fotoperiodo, oscurando la luce del sole o aumentando le ore di luce tramite lampade, sulla quantità d'acqua e nutrienti sull'aumento della temperatura d'inverno nel caso di serre riscaldate. Il principale svantaggio è legato all'impollinazione delle piante in quanto ci potrebbero essere delle contaminazioni, in questo caso infatti non è possibile isolare completamente la pianta dalle altre. Questo metodo porta con sé anche dei vantaggi, primo tra tutti i costi che risultano più contenuti, specialmente d'estate quando non è necessario apportare ulteriori ore di luce tramite lampade e riscaldare la serra.

La coltivazione outdoor di *C. sativa* è la più svantaggiosa e inadatta allo scopo di stabilizzare il genotipo: i fattori controllabili sono molto limitati e le piante sono soggette ad impollinazione libera e quindi la contaminazione può avvenire molto facilmente e il processo di stabilizzazione è inficiato.

1. Caratterizzazione botanica

Cannabis sativa L. è una specie erbacea annuale, appartenente alla famiglia Cannabaceae. Questa pianta è caratterizzata da una radice fittonante e un vigoroso fusto eretto di forma cilindrica, più o meno ramificato, dapprima pieno poi cavo, increspato longitudinalmente e può raggiungere un'altezza di 6 metri (Miller 1970; Wu et al. 2003). Le foglie basali sono opposte mentre quelle superiori alterne, palmatosette, con 3-9 foglioline; i lobi hanno forma oblungo-lanceolata, lunghi 3-20cm e larghi fino a 2cm, con apice acuminato e attenuati alla base, pubescenti, di color verde scuro superiormente e più pallido inferiormente; presentano venature actinodrome (Jiang et al. 2006). Hanno margine seghettato, con dentellature lungo i margini prominenti, ricurve e puntate verso le punte delle lamine fogliari. Ogni fogliolina ha una nervatura centrale primaria e diverse venature secondarie su entrambi i lati. Ciascuna delle venature secondarie esce obliquamente dalla nervatura centrale ed entra in una dentellatura del margine. Le venature sono sporgenti sul margine inferiore mentre sono impresse sul margine superiore formando scanalature. La coppia più bassa di foglioline è solitamente molto più piccola delle altre e punta all'indietro. Nelle piantine, il primo paio di foglie è composta da una sola fogliolina e la seconda e la terza coppia sono rispettivamente di tre e cinque foglioline (Potter 2009). Il picciolo è cilindrico, lungo fino a 7 cm, presenta un solco mediano lungo il lato superiore ed è ricoperto di peli protettivi; presenta anche tricomi ghiandolari ma solo nelle foglie sottostanti alle infiorescenze femminili.

Generalmente è una specie dioica, presentando le infiorescenze maschili e femminili su individui diversi, anche se raramente la si può trovare in forma monoica. I fiori maschili sono riuniti a formare delle infiorescenze, dette pannocchie, poste in posizione ascellare. I fiori nelle pannocchie si presentano solitari, a grappolo o in gruppi di 3 fiori. Ogni fiore è composto da cinque tepali, cinque stami e un pedicello sottile. I tepali sono ovato-oblungi, lunghi 2-4 cm, di colore verde giallastro o biancastro, con una fine peluria. Gli stami sono pendenti e sono costituiti da sottili filamenti e antere oblunghe e verdastre. I granelli di polline vengono liberati attraverso i pori terminali delle antere (UNODC 2009). I fiori femminili sono appaiati, sempre in posizione ascellare, ma in corrispondenza delle due stipole, piccole, acuminate e caduche. Ogni fiore è costituito da un ovario con uno stilo che termina in un paio di lunghi stimmi sottili e pubescenti

all'apice, un perianzio membranoso che circonda l'ovaio e una brattea. Il perianzio è trasparente, liscio o leggermente sfrangiato lungo il margine, a maturità copre circa i due terzi dell'ovaio. Le brattee sono verdi, scabrose, acuminate all'apice, ricoperte di tricomi ghiandolari, con lembi sovrapposti, che racchiudono il fiore femminile eccetto gli stigmi. Il frutto è un achenio, ovoidale, ellissoide o quasi sferico, di circa 4-6 mm di lunghezza e 3-4 mm di diametro, liscio, grigio brunastro e screziato, contenente un unico seme con pericarpo duro (UNODC 2009). La fioritura, che dipende dal fotoperiodo, avviene alla fine dell'estate (luglio-agosto) con l'accorciarsi delle ore di luce, e l'impollinazione è anemofila (Mohan Ram and Nath, 1964).

2. Caratterizzazione Sistemica

2.1 Caratterizzazione sistemica formale

2.1.1 *Cannabis sativa*

Il nome “*Cannabis sativa*” è stato coniato per la prima volta da Ermolao Barbaro (Barbaro, 1516) e ripreso poi da Linneo (1753), il quale fece una descrizione molto breve della pianta, facendo un resoconto generico dei fiori appartenenti al genere *Cannabis* e descrisse il frutto come una noce. Citò dunque quattro sinonimi di *C. sativa* (*C. foliis digitata*, *C.mas*, *C.erratica*, *C.femina*) di quattro diversi autori (Dalibard, van Royen d'Aléchamps e Bauhin) tutti provenienti dal nord Europa, ed escluse dalla tassonomia di *C. sativa* gli individui provenienti dal continente Asiatico. Il campione d'erbario depositato da Linneo (Fig. 1) ha la morfologia tipica di una pianta autoctona nord-europea da fibra: foglie sottese alle infiorescenze scarse di tricomi ghiandolari, infiorescenze ariose e sciolte, non dense, contenenti semi di grande dimensione (4,8mm x 2,5mm) di colore verde e con un fine motivo reticolato (Stearn, 1974).

2.1.2 *Cannabis indica*

La denominazione *Cannabis indica* è stata coniata da Lamarck riferendosi a piante del genere *Cannabis* provenienti da India, Sud-Est asiatico e Sud Africa. La descrizione botanica di Lamarck differisce da quella di Linneo per alcuni tratti che definì “ben distinti” da *C. sativa*, che comprendevano lo stelo, la struttura più ramificata, i fiori più compatti che sottendevano foglie cosparse di abbondanti tricomi ghiandolari (Fig. 1). Inoltre la sostanziale differenza era data dalla psicoattività di queste piante, descritta da Lamarck come “una sorta di ubriachezza che fa dimenticare i propri dolori e produce una forte allegria” (Lamarck, 1785).



[Figura 1: a sinistra il campione di *Cannabis sativa* L. depositato in erbario da Linneo nel 1753; a destra il campione di *Cannabis indica* Lam. depositato in erbario da Lamarck nel 1785; foto di McPartland e Herb P. rispettivamente]

2.1.3 *Cannabis ruderalis*

In letteratura è presente una terza tipologia di *Cannabis*: la *Cannabis selvatica*. Tale varietà comprendeva uno spettro piuttosto ampio di piante che vanno dalle indigene, alle naturalizzate, a quelle che sono sfuggite dalle coltivazioni (Small 1984, 2015).

Zinger (1898) fu il primo a descrivere le caratteristiche comuni alla *Cannabis selvatica*: queste producevano piccoli frutti con una base protuberante e conica, ed un perianzio persistente, in grado di camuffare il frutto donandogli una superficie opaca e cosparsa di macchioline scure (Fig. 2). Vavilov (1922) chiamò le piante che portavano queste caratteristiche *C. sativa* var. *spontanea*, mentre Janischevsky (1924) conì una nuova specie, *Cannabis ruderalis*, ma aggiunse anche un'alternativa al rango tassonomico: *C. sativa* var. *ruderalis*. Successivamente affermerà “sono incline a considerare questa pianta come una varietà ben distinta”.

Schoenmakers (1986) ha raccolto il germoplasma “Ruderalis” vicino ai confini tra Ungheria e Ucraina. Le foto che scattò alle “Ruderalis” mostravano piante con forte dominanza apicale e molto poco ramificate. Nella tassonomia volgare di oggi, “Ruderalis” è applicato ad un crescente e mutevole assortimento di piante che esibiscono da uno a tre di questi tratti: contenuto in Cannabidiolo (CBD) e

Tetraidrocannabinolo (THC) simili, morfologia selvatica, e fioritura non dipendente dal fotoperiodo (volgarmente detta “autofiorente”).



[Figura 2: a sinistra rappresentazione di Zinger (1898) di un seme di *Cannabis domestica* (1) e selvatica (2); a destra pianta di *Cannabis sativa* var. *spontanea* Vav. Depositata in erbario; foto di McPartland]

2.2 “Indica” e “Sativa” nella nomenclatura volgare

Il dibattito sulla classificazione tassonomica tra *Cannabis sativa* L. e *Cannabis indica* Lam. ha come origine la diversa descrizione affibbiata da questi due autori, aggravato successivamente dall’utilizzo della nomenclatura volgare “Sativa” e “Indica”, la quale non è correlata con quella utilizzata per le specie descritte da Linneo e Lamarck. Il primo precoce e massiccio utilizzo dei termini “Sativa” and “Indica” lo si può trovare nei cataloghi olandesi di semi di *Cannabis*; essi erano classificati per lo più in base alla morfologia, al tempo di fioritura e al contenuto di cannabinoidi delle diverse piante (Watson 1985).

In contraddizione con la caratterizzazione tassonomica tradizionale, il commercio di Marijuana (ossia il termine popolare utilizzato per indicare infiorescenze femminili ad alto contenuto di THC) impiegò il termine “Sativa” per indicare piante con un potere inebriante caratterizzate da un alto livello di THC e un bassissimo livello di CBD, mentre il termine “Indica” per designare piante altrettanto capaci di inebriare ma con un

livello più elevato di CBD. “Sativa” e “Indica” fanno quindi riferimento a due differenti gruppi di piante ad alto THC domestiche in Asia (Small, 2017).

De Meijer and van Soest (1992) hanno quindi introdotto la tassonomia volgare alla letteratura peer-reviewed: “Indica” si riferisce a piante compatte, di bassa statura (alte circa 1 metro) con una forma simile ad un albero di Natale in miniatura, dalle foglioline larghe con fioritura a rapida maturazione, tipica delle piante dell’Afghanistan. “Sativa” si riferisce a piante snelle, alte, ramificate se coltivate in buone condizioni, con foglioline strette con fioritura a lenta maturazione, tipica di piante provenienti dall’India meridionale e loro discendenti in Thailandia, Sud ed Est Africa, Colombia e Messico.

Un’ulteriore distinzione è stata fatta da Hillig (2004) che, analizzando la variazione genetica del profilo dei cannabinoidi, dei terpeni e dei tratti morfologici, fece un passo indietro rispetto alla nomenclatura volgare di “Indica” e “Sativa”, applicando il nome “narrow-leaflet drug (NLD) biotype” (biotipo a fogliolina stretta) alle piante corrispondenti al termine “Sativa”, mentre ha applicato il nome “wide-leaflet drug (WLD) biotype” (biotipo a fogliolina larga) alle piante corrispondenti al termine “Indica”.

Il modello di classificazione di Small e Cronquist (1976) tratta le piante volgarmente chiamate “Sativa” e “Indica” come sottopopolazioni di *C. sativa* subsp. indica. “Ruderalis” rappresenta un mutevole assortimento di piante, che includono *C. sativa* subsp. sativa e recenti ibridi.

De Meijer (1999) considera *C. sativa* come la sola e unica specie del genere *Cannabis*, in quanto notò la mancanza di barriere nella capacità di riprodursi tra quelle che furono classificate come specie distinte. Inoltre considera le piante coltivate e selvatiche come estremi di un gradiente, quindi non riconosce quest’ultime come una differente specie.

2.3 Nuove tecniche per stabilire la corretta caratterizzazione tassonomica

McPartland and Guy (2014) utilizzarono la tecnica del DNA *Barcoding*, prendendo in esame diversi loci (*rbcL*, *matK*, *trnH-psbA*, *trnL-trnF*, ITS) per misurare la divergenza tra la popolazione di diverse piante. La principale divergenza tra *C. sativa* e *C. indica* fu pari a 0.41%. Come metro di paragone, la divergenza osservata tra piante catalogate come diverse varietà (*Camellia sinensis* var. *sinensis* e *C. sinensis* var. *assamica*) fu

dello 0.43%, mentre una divergenza del 3.0% separa piante appartenenti a specie diverse come *Humulus lupulus* e *Humulus japonicus*.

In uno studio (Zhang et. al, 2018) è stata analizzata la variazione della sequenza di cinque regioni del DNA del cloroplasto (cpDNA) di un vario numero di campioni di piante appartenenti al genere *Cannabis*, classificati secondo tre aplogruppi, High (H), Medium (M), Low (L), distinti secondo il gradiente di distribuzione latitudinale. È stata dunque esaminata la correlazione tra la distanza genetica e la distanza geografica ed è stato analizzato se i fattori climatici sono correlati con le frequenze dell'aplogruppo del cpDNA delle popolazioni testate. Per la struttura filogeografica sono stati individuati alcuni modelli denominati "isolamento per distanza" e la durata del giorno è risultata essere il fattore più importante (tra 20 fattori bioclimatici presi in considerazione) che ha influenzato le strutture della popolazione. Considerando le strutture filogeografiche distintive e il fatto che non ci siano barriere per incroci tra individui, gli autori raccomandano che la *Cannabis* sia riconosciuta come un genere monotipico caratterizzato da *Cannabis sativa* L., contenente tre sottospecie: subsp. *sativa*, subsp. *indica*, e subsp. *ruderalis*.

3. Principali metaboliti del genere *Cannabis*

3.1 Fitocannabinoidi e biosintesi

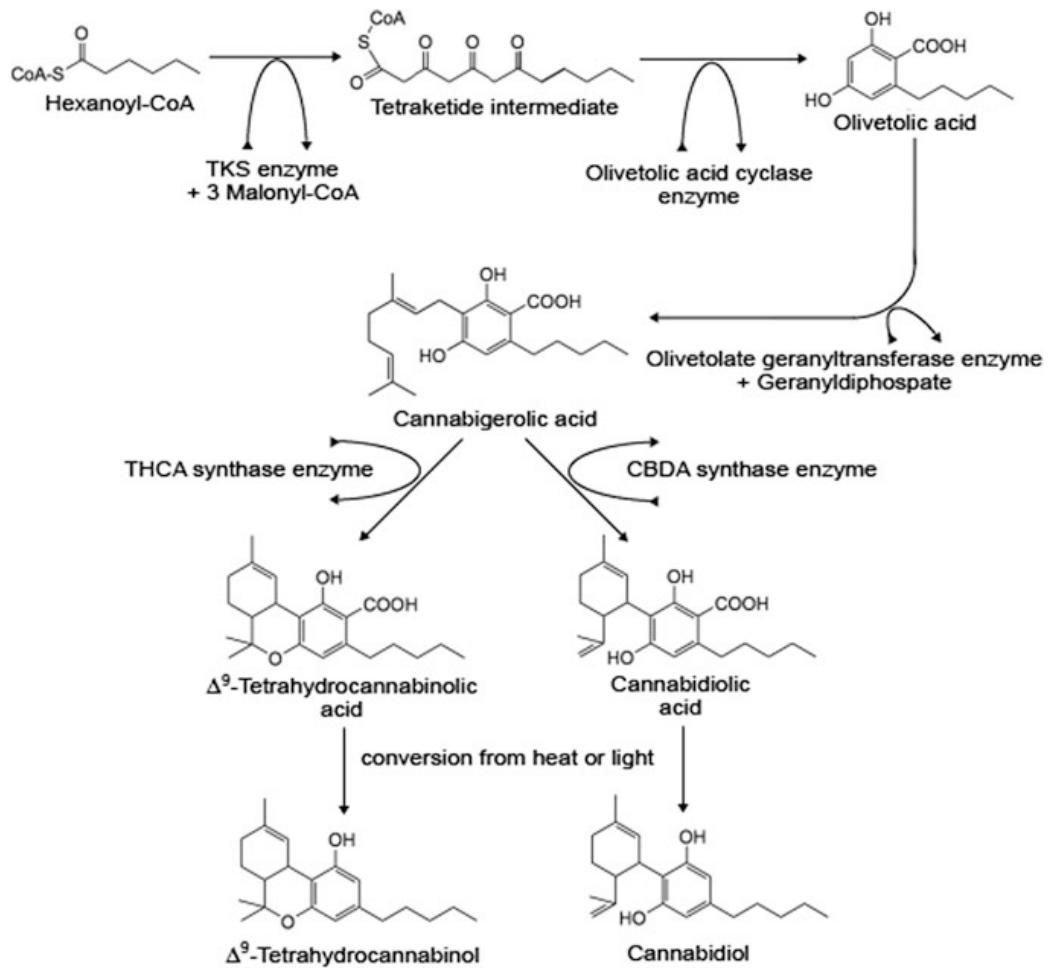
Il termine fitocannabinoidi definisce meroterpenoidi, ossia composti con una parziale struttura terpenica, che possiedono un nucleo resorcinico tipicamente accompagnato da una catena laterale alchilica, anche se a volte può comparire una catena laterale isoprenica o arilalchilica in posizione para (Hanuš, L.O. et al. 2016). La catena laterale alchilica contiene tipicamente un numero dispari di atomi di carbonio, dove gli orcinoidi contengono un carbonio, i varinoidi tre e gli olivetoidi cinque. Cannabinoidi con un numero pari di atomi di carbonio nella catena laterale sono noti ma rari.

I fitocannabinoidi in *Cannabis sativa* L. sono prodotti ed accumulati nei tricomi ghiandolari, più precisamente nei tricomi ghiandolari a peduncolo capitato (CSG), i quali sono formati da una testa simil-sferica resinosa che si trova in cima ad uno “stelo” pluricellulare. La testa del tricoma incorpora una rosetta di cellule secretorie a disco nella base, coperte da una cuticola o una guaina. I cannabinoidi e i terpenoidi si accumulano in una cavità tra le cellule a disco e la cuticola (Kim and Mahlberg 1997; Happyana et al. 2013). Le cellule del disco, inoltre, producono enzimi biosintetici, come il THCA sintasi, riversandoli nella cavità secretoria (Sirikantaramas et al. 2005). Questi tricomi ghiandolari si ritrovano maggiormente nelle infiorescenze femminili e nelle foglie sottostanti ad esse.

I fitocannabinoidi hanno una origine biosintetica mista, sintetizzati a partire da acidi grassi e precursori terpenici. La porzione terpenica è costituita da Isopentenil-pirofosfato (IPP) e dimetilallil-pirofosfato (DMAPP) prodotti attraverso la via biosintetica del deossixilulosio fosfato- metileritritolo (DOXP-MEP) per oltre il 98%, la quale opera nei plastidi, per poi condensarsi testa-coda a formare geranil-pirofosfato (GPP) grazie all'enzima catalitico geranil pirofosfato sintasi (Fellermeier, 2001).

La porzione polichetidica è data dalla presenza di uno di questi acidi: orcinolico, varinolico o, molto più comunemente, olivetolico. Quest'ultimo è prodotto dalla condensazione catalitica dell'esanoil-CoA, che deriva dall'acido esanoico, con tre molecole di malonil-CoA grazie agli enzimi polichetide sintasi (PKS) e olivetolo acido ciclasi (OAC) (Gagne SJ et. al 2012).

Successivamente, l'enzima geranilpirofosfato/olivetolato geranyl trasferasi (GOT) anche chiamato acido cannabigerolico sintasi (CBGAS), catalizzerà la condensazione dell'acido olivetolico con il geranilpirofosfato a formare acido cannabigerolico (CBGA), noto per essere il precursore di alcuni dei più importanti fitocannabinoidi come THCA e CBDA (Fig. 3) (Gagne SJ et. al 2012; Taura et. al 2007).



[Fig. 3: schema della biosintesi dei due principali fitocannabinoidi]

3.1.1 Ereditarietà genetica dei fitocannabinoidi

De Meijer et al. (2003) ipotizzò che il chemiotipo fosse determinato da due alleli in un singolo locus genico, chiamato locus *B*. Gli autori chiamarono l'allele *B_T* quello codificante per l'enzima THCA-S, mentre *B_D* l'allele codificante per l'enzima CBDA-S. Piante che producono in prevalenza THC e pochissimo o nullo CBD hanno un genotipo di tipo *B_T/B_T*. Piante che producono in prevalenza CBD e pochissimo o nullo THC

hanno un genotipo di tipo B_D/B_D . Piante che producono contemporaneamente in misura significativa THC e CBD hanno un genotipo di tipo B_T/B_D . Si può notare così che gli alleli B_T e B_D non esprimono il classico comportamento genetico mendeliano dei tratti binari, dove un allele è dominante ed uno recessivo. Nel modello descritto da de Meijer, gli alleli che codificano per THCA-S e CBDA-S sono codominanti in quanto entrambi gli alleli possono essere espressi contemporaneamente. Questa ipotesi è supportata da uno studio condotto precedentemente (Yotoriyama et al. 1980) dove sono state incrociati individui maschi THCA-dominanti con individui femmine CBDA-dominanti e la generazione F_2 risultante ebbe un rapporto THCA-dominante / THCA-CBDA in compresenza / CBDA-dominante con un rapporto circa 1:2:1.

Tuttavia il modello di de Meijer necessita di successive validazioni in quanto ci sono discrepanze nell'ipotesi: i rapporti THC/CBD nella *Cannabis* mostrano variazioni continue e non si segregano sempre in popolazioni di 100% THC, 50:50 o 100% CBD.

Indagando sulla validità di questo modello, Kojoma et al. (2006) clonarono la sequenza del THCA-S di “piante da fibra” che producevano poco o nullo THC, quindi apparentemente appartenenti ad un genotipo B_D/B_D . Si scoprì che molte sequenze del THCA-S testato erano polimorfiche con un totale di 37 amminoacidi sostituiti. Gli autori dunque ipotizzarono che il polimorfismo diminuisse l'attività del THCA-S in queste piante da fibra.

Weiblen et al. (2015) utilizzarono invece la PCR quantitativa in tempo reale (Q-PCR) per investigare la presenza di geni codificanti per THCA-S e CBDA-S. Il campione analizzato ad alto THC della varietà “Skunk No.1” conteneva tre copie polimorfiche di THCA-S e due copie di CBDA-S. Le copie di CBDA-S contenevano un codone di terminazione e mutazioni genetiche che le resero non funzionali. Il campione ad alto CBD della varietà “Carmen” conteneva una copia di CBDA-S e tre copie di THCA-S. In questo caso le copie di THCA-S risultarono polimorfiche e probabilmente non funzionanti. Alla luce di queste analisi si può intuire che, in quanto il gene codificante per la sintasi non è funzionale, non c'è concorrenza tra i diversi alleli per il substrato e di conseguenza quasi tutto il CBGA viene convertito nel cannabinoide che ha la propria sintasi funzionale.

McKernan et al. (2016) usarono il sequenziamento genomico “Illumina” accoppiato con due differenti primer per generare ampliconi dei THCA-S in tredici varietà medicinali,

che includevano anche quattro varietà ad alto CBD. Il risultato di queste analisi fu che solo una varietà conteneva una singola copia di THCA-S, mentre le altre contenevano più copie polimorfiche. La varietà ad alto THC “Chemdog” conteneva cinque copie polimorfiche di THCA-S, di cui una con un codone di interruzione, una inattiva e le rimanenti attive. La varietà “Sour Tsunami” a CBD prevalente, espresse sei copie di THCA-S, tre delle quali con codone di interruzione, una inattiva, una sconosciuta ed una attiva responsabile della piccola quantità di THCA prodotto dalla pianta.

Alla luce di questi ultimi studi si evince che durante il processo di stabilizzazione di un genotipo, essendo le sintasi dei cannabinoidi polimorfiche, la selezione degli individui viene effettuata sulla base del fenotipo, il quale fornisce in modo lampante informazioni sullo stato di attività o inattività di queste sintasi e sullo stato di salute dell’individuo, condizioni fondamentali per la produzione di cannabinoidi.

3.2 Olio essenziale

Un olio essenziale è un liquido aromatico, volatile, estratto dalle sommità fiorite mediante distillazione in corrente di vapore, estrazione con solvente o altre metodiche più recenti. I costituenti primari dell’olio essenziale sono i terpenoidi e la *Cannabis* ne produce circa 200 diversi, per lo più monoterpenoidi e sesquiterpenoidi (Rice and Koziel 2015).

La biosintesi dei terpenoidi nella *Cannabis* passa attraverso due vie indipendenti:

- La via del 2-metil-D-eritritolo-4-fosfato (MEP) è responsabile della produzione di monoterpenoidi e di alcuni sesquiterpenoidi. Questa è la via biosintetica dal quale deriva la maggior parte del GPP utilizzato dalla pianta per produrre cannabinoidi;
- La via del mevalonato (MVA) è responsabile della maggior parte dei sesquiterpenoidi.

I terpenoidi sono biosintetizzati nei tricomi ghiandolari e costituiscono fino al 10% del contenuto della testa del tricoma ghiandolare (Potter 2009).

Per le piante coltivate in campo, Mediavilla e Steinemann (1997) riportano una resa media di 1,3 L di olio essenziale per tonnellata di piante non essiccate, pari a circa 10 L/ha. La prevenzione dell’impollinazione aumenta la resa: de Meijer e Mediavilla (1998) hanno ottenuto 18 L/ha da colture dioiche *sinsemilla* (senza semi), contro 8 L/ha

da colture impollinate. Lo stadio di crescita e la data di raccolta influenzano il rapporto monoterpenoide/sesquiterpenoide.

Casano et al. (2011) hanno confrontato 16 varietà ibride caratterizzate come "principalmente indica" o "prevalentemente sativa" per valutarne il profilo terpenico. I due gruppi differivano statisticamente nei loro profili in quanto piante "per lo più indica" avevano livelli più elevati di limonene, β -mircene, canfene e diversi picchi non identificati; mentre le piante "per lo più sativa" avevano livelli più elevati di sabinene, 1,8-cineolo, cis- β -ocimene, trans- β -ocimene, α -terpinolene e moltri altri picchi non identificati.

Attraverso i tre principali chemiotipi (a THC prevalente, a CBD prevalente e misto) definiti da de Meijer (2003), i profili terpeni ci mostrano molte variazioni tra le diverse cultivar, con mircene, limonene, α -pinene, α -terpinene o β -cariofillene come componenti variabili principali (Fischedick et al., 2010; Fischedick, 2017; Richins et al., 2018; Reimann-Philipp et al., 2019).

4. Tecniche di breeding

4.1 Differenziazione e reversione sessuale in *Cannabis sativa*

Il corredo cromosomico di *Cannabis sativa* è composto da nove coppie di autosomi e da una coppia di eterosomi: X e Y. Il sesso maschile è dotato di una coppia XY e quello femminile di una coppia XX, analogamente a quanto riscontrato in altre specie dioiche come *Humulus lupulus*, *Silene latifolia*, *Coccinia indica*, *Rumex hastatulus*;

Il cromosoma Y nella Cannabis è subtelocentrico e caratterizzato da un satellite all'estremità del braccio corto; inoltre, il braccio lungo è particolarmente sviluppato e probabilmente responsabile della differenza riscontrata tra le dimensioni del genoma maschile e femminile (rispettivamente 1683 e 1636 Mbp; Sakamoto et al., 1998). Il cromosoma X è submetacentrico e porta un segmento di DNA satellite alle estremità del braccio corto. L'espressione fenotipica del sesso nella *Cannabis sativa* mostra una certa flessibilità: a volte si osservano anomalie nello sviluppo dei fiori, come la comparsa di fiori ermafroditi o lo sviluppo di infiorescenze miste (portanti sia fiori maschili che femminili), come quelle che si verificano nei fenotipi monoici. Le varietà monoiche sono infatti state sviluppate da alcune di queste mutazioni e necessitano di una rigorosa selezione per mantenere questa caratteristica durante la moltiplicazione dei semi a causa della natura recessiva del tratto.

La determinazione del sesso in *C. sativa* sembra essere controllata da due geni specifici in loci tra loro collegati (Bergero e Charlesworth, 2008; Divashuk et al., 2014; Henry et al., 2018): le piante maschili richiederebbero un soppressore dominante degli organi femminili (Su^F) e un attivatore dominante della maschilità (M), mentre le piante femminili condividerebbero l'omozigosi degli alleli recessivi in entrambi i loci ($su^F su^F$ mm). Ai fini della riproduzione, le piante maschili e femminili possono essere identificate nelle prime fasi di sviluppo attraverso l'uso di marcatori del DNA specifici per l'eterosoma Y (Mandolino et al., 1999; Törjék et al., 2002). Considerando che la determinazione del sesso è completamente reversibile, non può essere esclusa l'ipotesi che i geni coinvolti nello sviluppo di entrambi i sessi rimangano potenzialmente funzionali durante l'intero ciclo di vita.

In alcuni genotipi di *Cannabis sativa*, infatti, è possibile ottenere una reversione totale o parziale del sesso attraverso il trattamento con agenti chimici mascolinizzanti o femminilizzanti, efficace nel determinare la formazione degli organi riproduttivi del sesso opposto anche in piante già sessualmente ben differenziate. Le sostanze chimiche che inibiscono la biosintesi o l'attività dell'etilene, come l'amminoetossivinilglicina, il tiosolfato d'argento e il nitrato d'argento, hanno un effetto mascolinizzante, mentre i precursori o attivatori della biosintesi dell'etilene, come etephon, hanno un effetto femminilizzante (Mohan Ram & Sett, 1982a, 1982b).

Mohan Ram e R. Sett (1982) riuscirono a mascolinizzare piante di *Cannabis sativa* geneticamente femminili utilizzando nitrato d'argento (AgNO_3) e il complesso anionico di tiosolfato d'argento (STS) $[(\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)_2)]^{3-}$ dimostrando negli esperimenti che quantità di 50 e 100 μg di AgNO_3 sono efficaci nell'indurre fiori maschili fertili ai nodi, sull'asse principale e anche sui rami laterali appena formati. Il trattamento con 10 μg si è invece rivelato inefficace, mentre l'applicazione di 150 μg ha fortemente inibito la crescita dei meristemi apicale e laterali.

L'utilizzo di ioni d'argento per influenzare l'attività dell'etilene si era già dimostrato efficace in precedenti esperimenti in altre specie di piante. Beyer (1976a) ha dimostrato che gli ioni d'argento applicati sotto forma di AgNO_3 bloccavano l'azione dell'etilene esogeno applicato a piante di *Pisum sativum*, osservando ritardo della crescita, rigonfiamento dello stelo e crescita orizzontale. L'applicazione di AgNO_3 ha effettivamente cambiato l'espressione sessuale da femmina a maschio in una pianta di cetriolo (*Cucumis sativus*) ginoica (Beyer 1976b), così come in un esemplare di *Cucumis sativus* monoico, dove ha indotto la produzione di fiori femminili (Takahashi e Suge 1980).

Durante la sperimentazione di Mohan Ram e Sett (1982), inoltre, il complesso anionico di tiosolfato d'argento (STS) è risultato essere più efficace del AgNO_3 nell'indurre fiori maschili sulle piante femminili. Il numero di fiori maschili indotti per pianta e la percentuale di fiori di sesso alterato in ciascun ramo laterale trattato erano più alti nel trattamento con STS. Lo studio ha quindi indicato che l'applicazione dell'argento come complesso anionico è più efficace di quella nella forma cationica.

4.2 Inbreeding e vigore ibrido

La reversione sessuale nella *Cannabis* è una procedura utile al fine di praticare l'autoimpollinazione che di norma non avrebbe luogo in quanto è una pianta dioica.

Poiché i cromosomi sessuali provengono dalla stessa pianta, l'autoimpollinazione determina *inbreeding*, ovvero l'accoppiamento tra individui consanguinei, il cui grado di parentela risale ad almeno tre generazioni precedenti. La probabilità della progenie di due genitori imparentati di ereditare due copie identiche dello stesso allele di un gene già presente in un antenato comune viene stimata attraverso il coefficiente di *inbreeding*, che valuta il livello medio di parentela tra gli individui.

L'*inbreeding* può determinare effetti negativi sia a livello individuale che di popolazione, in quanto degli alleli recessivi deleteri, che in genere sono associati a caratteri fenotipici svantaggiosi, potrebbero fissarsi in modo casuale. L'aumento della consanguineità genera quindi una serie di condizioni sfavorevoli definite "depressione da *inbreeding*" (Davenport, 1908) le quali si manifestano prevalentemente nei caratteri che riguardano la sopravvivenza e le capacità riproduttive (mortalità, fecondità, natalità) oppure le potenzialità evolutive (adattamento alle variazioni ambientali e resistenza alle malattie). Quindi, quando una pianta viene riprodotta per autoimpollinazione, gli alleli recessivi deleteri che non erano espressi nella condizione di eterozigosi diventano omozigoti e vengono espressi, permettendo, durante un processo di selezione, di eliminare tutti gli individui che manifestano i caratteri che si vogliono scartare. L'autoimpollinazione però si dimostra anche essere utile per fissare dei tratti desiderabili. Una linea di piante consanguinee con un alto grado di omozigosi si può infatti sviluppare a partire da piante selezionate (con il minor numero possibile di caratteri negativi), che vengono autoimpollinate ripetutamente. Le popolazioni S1 o F2 (se la pianta di partenza è un ibrido) sono eterogenee, così come i risultati della segregazione dei tratti; per il ciclo di autoimpollinazione successivo, vengono selezionati gli individui migliori ed entro la terza generazione (S3) le piante nella progenie si dimostrano già abbastanza uniformi. Dopo circa 6-8 generazioni di autoimpollinazione, gli effetti negativi della consanguineità cessano, in quanto si sono selezionate le piante che mostravano una minor depressione da *inbreeding* (Barcaccia et. al, 2020). Attraverso questa procedura è possibile raggiungere un livello di

omozigosi in cui gli individui siano uniformi nelle caratteristiche e rimarranno tali sotto la continua autoimpollinazione, senza ulteriori perdite di vigore.

Ottenere delle piante con un alto grado di omozigosi permette poi di incrociarle con altri individui ad alto grado di omozigosi per ottenere ibridi F_1 caratterizzati da un alto valore di eterosi o vigore ibrido. Il vigore ibrido (G. H. Shull, 1948), può essere definito come l'aumento delle dimensioni, del vigore, della fertilità e della produttività complessiva di una pianta ibrida, rispetto al valore medio del genitore o dei due genitori. Il vantaggio del vigore ibrido si osserva quando si incrociano genitori geneticamente diversi e l'individuo risultante supera di gran lunga, nei termini sopracitati, il genitore migliore. L'eterosi è solitamente manifestata da piante altamente eterozigoti prodotte incrociando due diversi genotipi antagonisti, cioè utilizzando linee parentali che mostrano un'elevata omozigosi per le forme geniche antagoniste nella maggior parte dei loci.

In passato sono state avanzate due teorie per spiegare la base genetica del motivo per cui il vigore perso durante l'*inbreeding* tenda ad essere ripristinato dopo un incrocio F_1 : la teoria della dominanza e la teoria della sovradominanza.

La teoria della dominanza (Davenport, 1908) presuppone che il vigore nelle piante sia condizionato dagli alleli dominanti, essendo gli alleli recessivi deleteri o neutri. Ne consegue che un genotipo con più alleli dominanti sarà più vigoroso di uno con pochi alleli dominanti. Di conseguenza, l'incrocio di due genitori con alleli dominanti complementari concentrerà nell'ibrido alleli più favorevoli rispetto a entrambi i genitori.

La teoria della sovradominanza (Shull, 1908; East, 1908) presuppone invece che gli alleli di un gene siano contrastanti, ma ognuno abbia un diverso effetto favorevole nella pianta. Di conseguenza, un locus eterozigote avrebbe un effetto positivo maggiore rispetto a un locus omozigote, quindi un genotipo con più loci eterozigoti sarebbe più vigoroso di uno con meno loci eterozigoti.

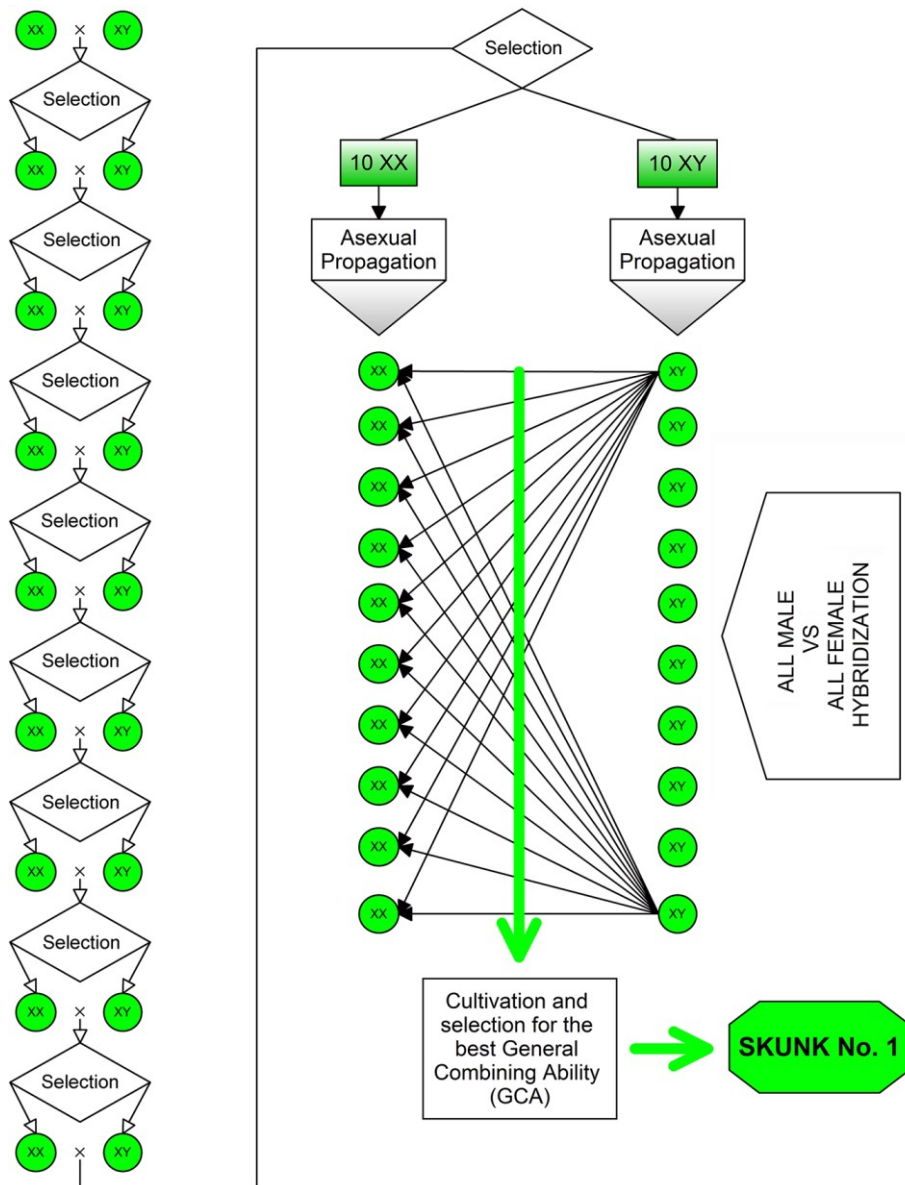
Queste due ipotesi, tuttavia, si sono rivelate superate in quanto, più recentemente, altri studi (Hochholdinger 2018; Baldauf et. al 2018) hanno analizzato l'espressione genica associata al vigore ibrido, ipotizzando che questo sia il risultato dalla sommatoria di molteplici alleli attivi che convergono dalle due linee parentali auto-fecondate negli ibridi; in tal caso i geni attivi sarebbero posti in loci differenti tra le due linee e quindi nell'ibrido si sommano, riattivando molti geni inattivi che complessivamente risultano, nell'ibrido di prima generazione, in numero molto maggiore rispetto alle due linee

originarie. La depressione da *inbreeding* delle piante auto-fecondate potrebbe quindi dipendere da una crescente inattivazione genica, che aumenta ad ogni generazione, e che può riguardare uno o entrambi gli alleli in molteplici loci genici delle linee auto-fecondate. Tale teoria si pone in una posizione nuova e differente rispetto a quello delle teorie precedenti, che spiegano invece il fenomeno di depressione da *inbreeding* delle linee omozigoti con la prevalenza di geni recessivi allo stato omozigote.

4.3 Esempio di ibrido di *Cannabis sativa*: “Skunk No.1”

Il primo ibrido di *Cannabis* NLD/BLD (Narrow Leaflet Drug/Broad Leaflet Drug) fu la "Skunk No. 1" prodotta all'inizio degli anni '70 (Figura 4).

Per la produzione di questo ibrido sono state coltivate diverse piante di una varietà locale della California, probabilmente un ibrido 3/4 NLD e 1/4 BLD (Colombiana/Afgana × Messicana) e tutte le femmine sono state incrociate con un singolo maschio selezionato. Una femmina identificata come "Skunk no. 1" è stata individuata come la più produttiva e la più potente, diventando la capostipite di tutte le generazioni successive. Per le successive nove generazioni ciascuna delle piante femminili è stata fertilizzata dal polline di un maschio selezionato dalla progenie dell'anno precedente e dopo solo tre generazioni, "Skunk No.1" si è dimostrata relativamente omogenea. Dalla progenie della nona generazione sono stati poi selezionati dieci maschi e dieci femmine, riprodotti asessualmente per preservare i loro genotipi unici: le piante femminili in base a vigore, potenza, tipo di effetto, resa dei fiori, rapporto fiore/foglia elevato, sviluppo delle ghiandole resinose, quantità di ramificazioni e resistenza ai parassiti, aromi e sapori floreali attraenti; mentre quelle maschili per il loro vigore, resistenza ai parassiti, forma di crescita e aroma. Il polline di un singolo maschio è stato utilizzato per fertilizzare una singola copia di ciascun clone femminile, ottenendo cento incroci individuali. Sono stati quindi seminati duecento semi di ciascun incrocio per un totale di ventimila e i discendenti sono stati valutati per il grado di omozigosi dei loro tratti agronomici favorevoli arrivando quindi a selezionare cinque piante femminili e tre maschili che sono state propagate asessualmente e tuttora utilizzate per produrre ibridi con altre cultivar omozigoti o per produrre semi venduti commercialmente sotto il nome di "Skunk No. 1" (Clarke & Merlin, 2016).



[Fig. 4: rappresentazione schematica del metodo utilizzato per lo sviluppo della varietà di *C. sativa* "Skunk No. 1"]

Conclusioni

Dall'analisi della letteratura fin qui svolta, emerge che la stabilizzazione di genotipi di *Cannabis sativa* è un sistema fondamentale per il raggiungimento di un alto valore di eterosi, fattore determinante per i programmi di breeding volti allo sviluppo di moderne cultivar di piante da fibra o ricche di cannabinoidi, in quanto ne aumenta la resa.

È stato infatti dimostrato come attraverso un aumento del grado di omozigosi di una linea di piante selezionate, incrociate con individui di un'altra linea con alto grado di omozigosi, sia possibile ottenere ibridi F_1 caratterizzati da un alto valore di vigore ibrido. Più recentemente, per aumentare il grado di omozigosi dei tratti che si vogliono selezionare, si utilizza la tecnica di *selfing* (autoimpollinazione); se adeguatamente sfruttata, questa tecnica si dimostra essere altamente vantaggiosa nei programmi di miglioramento delle colture, è infatti stato provato come riesca ad aumentare il grado di omozigosi al 99% dopo solo 7 generazioni. La tecnica del *selfing* risulta quindi più efficace rispetto al metodo *full-sibling* largamente utilizzato in precedenza, nel quale si incrociano individui fratelli e sorelle che appartengono alla stessa progenie e condividono le stesse due linee parentali, come già visto nell'esempio per produrre "Skunk No.1": quest'ultima infatti non riesce a raggiungere un livello di omozigosi prossimo al 99% nemmeno dopo 15 generazioni (Barcaccia et al. 2020).

La tecnica di *selfing* ha anche un ulteriore vantaggio, l'induzione chimica dei fiori maschili in piante femminili è infatti un mezzo per produrre polline geneticamente femminile (X), in quanto prodotto da una pianta femmina. Ne risulta che una successiva fecondazione di un ovario (X) con questo polline produrrà semi che daranno origine ad individui femminili (XX). Tale tecnica è sfruttata soprattutto nel caso in cui si vogliono selezionare piante ad alto contenuto di cannabinoidi, presenti nelle piante femminili, evitando quindi il processo di eliminazione degli individui maschili e portando ad un vantaggio di tipo economico in quanto si utilizzano minori risorse e minor spazio.

Bibliografia

Baldauf, J. A., Marcon, C., Lithio, A., Vedder, L., Altrogge, L., Piepho, H. P., ... & Hochholdinger, F. (2018). Single-parent expression is a general mechanism driving extensive complementation of non-syntenic genes in maize hybrids. *Current Biology*, 28(3), 431-437.

Barbaro, E, ed. (Dioscorides P). 1516. In hoc volumin haec continentur, Ioannis Baptistae Egnatii in Dioscoridem ab Hermolao Barbaro tralatum annotamenta. Aloisius & Franciscus Barbari, Venice.

Beyer, E.M. (1976 a): A potent inhibitor of ethylene action in plants. *Plant Physiol.* 58, 268-271

Beyer, E.M. (1976b): Silver ion: A potent antiethylene agent in cucumber and tomato. *HortScience* 11, 195-196

Casano S, Grassi G, Martini V, Michelozzi M (2011) Variations in terpene profiles of different strains of *Cannabis sativa* L. *Acta Horticulturae* 925:115–121

Clarke, R. C., & Merlin, M. D. (2016). Cannabis domestication, breeding history, present-day genetic diversity, and future prospects. *Critical reviews in plant sciences*, 35(5-6), 293-327.

Davenport, C. B. 1908. Degeneration, albinism and inbreeding. *Science* 28:454–455.

Davenport, G.C., & Davenport, C. B. (1908). Heredity of hair-form in man. *The American Naturalist*, 42(497), 341-349.

De Meijer EPM. 1999. "Cannabis germplasm resources," pp. 133–151 in. Ranalli P, ed. *Advances in Hemp Research*. Haworth Press New York.

De Meijer EPM, van Soest LJM. 1992. The CPRS Cannabis germplasm collection. *Euphytica* 62: 201–211.

De Meier EPM, Mediavilla V (1998) Factors influencing the yield and the quality of hemp (*Cannabis sativa* L.) essential oil. *J Ind Hemp Assoc* 5(1):16–20

De Meijer EPM, Bagatta M, Carboni A, Crucitti P, Cristiana Moliterni VM, Ranalli P, Mandolino G (2003) The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. *Genetics* 163:335–346

East, E. M. 1908. Inbreeding in corn. Report of the Connecticut Agriculture Experimental Station 1907:419–429

- Fellermeier, M., Eisenreich, W., Bacher, A., & Zenk, M. H. (2001). Biosynthesis of cannabinoids: Incorporation experiments with ¹³C-labeled glucoses. *European Journal of Biochemistry*, 268(6), 1596-1604.
- Fischedick J (2017) Identification of terpenoid chemotypes among high (2)-trans D9-tetrahydrocannabinol-producing *Cannabis sativa* L. cultivars. *Cannabis Cannabinoid Res* 2: 34–47
- Fischedick J, Van Der Kooy F, Verpoorte R (2010) Cannabinoid receptor 1 binding activity and quantitative analysis of *Cannabis sativa* L. smoke and vapor. *Chem Pharm Bull* 58:201–207
- Gagne SJ, Stout JM, Liu E, Boubakir Z, Clark SM, Page JE (2012) Identification of olivetolic acid cyclase from *Cannabis sativa* reveals a unique catalytic route to plant polyketides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:12811–12816
- Grant, S., A. Houben, B. Vyskot, J. Siroky, W.H. Pan, J. Macas & H. Saedler, 1994. Genetics of sex determination in flowering plants. *Dev Genet* 15: 214–230.
- Hanuš, L. O., Meyer, S. M., Muñoz, E., Taglialatela-Scafati, O., & Appendino, G. (2016). Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Natural product reports*, 33(12), 1357-1392.
- Happyana N, Agnolet S, Muntendam R, van Dam A, Schneider B, Kayser O (2013) Analysis of cannabinoids in laser-microdissected trichomes of medicinal *Cannabis sativa* using LCMS and cryogenic NMR. *Phytochemistry* 87:51–59
- Hillig KW, Mahlberg PG. 2004. A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in *Cannabis* (Cannabaceae). *American Journal of Botany* 91(6): 966-975.
- Hochholdinger, F., & Baldauf, J. A. (2018). Heterosis in plants. *Current Biology*, 28(18), R1089-R1092.
- Janischevsky DE. 1924. Янишевский. Форма конопли на сорных местах в Юго-Восточной России (A form of cannabis in wild areas of south-eastern Russia). Ученые записки Саратовского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского (Scientific Notes of the Saratov State University named after N. G. Chernyshevsky) 2(2): 3–17.
- Jiang HE, Li X, Zhao YX, Ferguson DK, Hueber F, Bera S, Wang YF, Zhao LC, Liu CJ, Li CS (2006) A new insight into *Cannabis sativa* (Cannabaceae) utilization from 2500-year-old Yanghai Tombs, Xinjiang, China. *J Ethnopharmacol* 108:414–422
- Kim ES, Mahlberg PG (1997) Immunochemical localization of tetrahydrocannabinol (THC) in cryofixed glandular trichomes of *Cannabis* (Cannabaceae). *Am J Bot* 84:336–342

- Kojoma M, Seki H, Yoshida S, Muranaka T (2006) DNA polymorphisms in the tetrahydrocannabinolic acid (THCA) synthase gene in “drug-type” and “fiber type” *Cannabis sativa* L. *Forensic Sci Int* 159(2–3):132–140
- Kriese U, Schumann E, Weber WE, Beyer M, Brhl L, Matthus B (2004) Oil content, tocopherol composition and fatty acid patterns of the seeds of 51 *Cannabis sativa* L. genotypes. *Euphytica* 137:339–351
- Lamarck JB. 1785. *Encyclopédie Méthodique* 1(2): 695. Panckoucke, Paris.
- Linnaeus C. 1753. *Species Plantarum* 2: 1057. Laurentii Salvii, Stockholm.
- McKernan KJ, Helbert Y, Tadigotla V, McLaughlin S, Spangler J, Zhang L, Smith D (2016) Single molecule sequencing of THCA synthase reveals copy number variation in modern drug-type *Cannabis sativa* L.
- McPartland, JM, Guy, GW. 2014. A question of rank: Using DNA barcodes to classify *Cannabis sativa* and *Cannabis indica*. Proceedings of the 24th annual symposium on the Cannabinoids. International Cannabinoid Research Society, Research Triangle Park, NC.
- Mediavilla V, Steinemann S (1997) Essential oil of *Cannabis sativa* L. strains. *J Int Hemp Assoc* 4 (2):82–84
- Miller NG (1970) The genera of Cannabaceae in the southeastern United States. *J Arnold Arboretum* 51:185–203
- Mohan Ram H. Y., Nath R (1964) The morphology and embryology of *Cannabis sativa* Linn. *Phytomorph* 14:414–429
- Mohan Ram, H. Y., & Sett, R. (1982a). Induction of fertile male flowers in genetically female *Cannabis sativa* plants by silver nitrate and silver thiosulphate anionic complex. *Theoretical and Applied Genetics*, 62(4), 369-375.
- Mohan Ram, H. Y., & Sett, R. (1982b). Reversal of ethephon-induced feminization in male plants of *Cannabis sativa* by ethylene antagonists. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 107(1), 85-89.
- Nelson RA (1996) *Hemp and history*, Rex Research, Jean NV. Accessed on the web Sep, 0420016,
- Potter D (2009) The propagation, characterisation and optimisation of *Cannabis sativa* as a phytopharmaceutical (PhD Thesis). Department of Pharmaceutical Science Research. King’s College, London
- Reimann-Philipp U, Speck M, Orser C, Johnson S, Hilyard A, Turner H, Stokes AJ, Small-Howard AL (2019) *Cannabis* chemovar nomenclature misrepresents chemical

and genetic diversity; survey of variations in chemical profiles and genetic markers in Nevada medical cannabis samples. *Cannabis Cannabinoid Res*

Rice S, Koziel JA (2015) Characterizing the smell of marijuana by odor impact of volatile compounds: an application of simultaneous chemical and sensory analysis.

Richins RD, Rodriguez-Uribe L, Lowe K, Ferral R, O'Connell MA (2018) Accumulation of bioactive metabolites in cultivated medical Cannabis. *PLoS One* 13: e0201119

Sakamoto, K., Y. Akiyama, K. Fukui, H. Kamada & S. Satoh, 1998. Characterization, genome size and morphology of sex chromosomes in hemp (*Cannabis sativa* L.). *Cytologia* 63: 459–464.

Schoenmakers N. 1986. The seed Bank 1986/1987 Catalogue. Drukkerij Dukenburg Printers, Nijmegen, The Netherlands.

Schultes RE, Klein WM Plowman T, Lockwood TE (1974) Cannabis: an example of taxonomic neglect. *Bot Mus Leaflets, Harvard Univ* 23:337–367

Shull, G. H. (1948). What is "heterosis"? *Genetics*, 33(5), 439.

Sirikantaramas S, Taura F, Tanaka Y, Ishikawa Y, Morimoto S, Shoyama Y (2005) Tetrahydrocannabinolic acid synthase, the enzyme controlling marijuana psychoactivity, is secreted into the storage cavity of the glandular trichomes. *Plant Cell Physiol* 46:1578–1582

Small E, Cronquist A (1976) A practical and natural taxonomy for Cannabis. *Taxon*: 405–435

Small E. 1984. "Hybridization in the domesticated-weed-wild complex," pp. 195–210 in Grant WF, ed. *Plant biosystematics*. Academic Press, NY.

Small E. 2015. Evolution and classification of Cannabis Sativa (marijuana, hemp) in relation to human utilization. *Botanical Review* 81: 189–294

Small E. 2017. *Cannabis: a complete guide*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Takahashi, H.; Suge, H. (1980): Sex expression in cucumber plants as affected by mechanical stress. *Plant Cell Physiol.* 21, 303-310

Taura, F., Sirikantaramas, S., Shoyama, Y., Yoshikai, K., Shoyama, Y., & Morimoto, S. (2007). Cannabidiolic-acid synthase, the chemotype-determining enzyme in the fiber-type Cannabis sativa. *FEBS letters*, 581(16), 2929-2934.

UNODC (2009) Recommended methods for the identification and analysis of Cannabis and Cannabis products (Manual). United Nations, New York

- Vavilov NI. 1922. Field crops of the southeast. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции (Bulletin of Applied Botany, Genetics, and Plant Breeding) 13 (Suppl. 23): 147–148.
- Watson DP. 1985. Cultivator's choice catalog #4. Self-published, Amsterdam, Holland
- Weiblen GD, Wenger JP, Craft KJ, ElSohly MA, Mehmedic Z, Treiber EL, Marks MD (2015) Gene duplication and divergence affecting drug content in *Cannabis sativa*. *New Phytol* 208:1241–1250
- Westgaard, M., 1958. The mechanism of sex determination in dioecious plants. *Adv Genet* 9: 217–281.
- Wu Z, Zhou Z-K, Bartholomew B (2003) Cannabaceae. In: Wu Z, Raven PH (eds) *Flora of China*. Science Press, Beijing
- Yotoriyama M, Ito I, Takashima D, Shoyama Y, Nishioka I (1980) Plant breeding of *Cannabis*. Determination of cannabinoids by high-pressure liquid chromatography. *Yakugaku Zasshi* 100:611–614
- Zhang, Q., Chen, X., Guo, H., Trindade, L. M., Salentijn, E. M., Guo, R., ... & Yang, M. (2018). Latitudinal adaptation and genetic insights into the origins of *Cannabis sativa* L. *Frontiers in plant science*, 9, 1876.
- Zinger, N. 1898. Beiträge zur Kenntnis der weiblichen Blüten und Inflorescenzen bei Cannabineen. *Flora oder Allgemeine Botanische Zeitung* 85: 189–253.
- Zuardi AW (2006) History of *Cannabis* as a medicine: a review. *Braz J Psychiatry* 28:153–157