

Métodos de biología molecular de aplicación en la industria del cannabis

El tamaño del mercado mundial de cannabis alcanzó un valor de aproximadamente USD 32,23 mil millones en 2023, mientras que las perspectivas para 2024-2032 rondan una tasa de crecimiento anual compuesto del 23,50%, alcanzando un valor de USD 215,42 mil millones para 2032 [1].



JOANA CRUZ

DIRECTORA DEL CENTRO DE COMPETENCIA EN BIOLOGÍA MOLECULAR (CCMB) DE SGS

Entre los impulsores de dicho crecimiento se encuentran: 1) una mayor conciencia de los beneficios terapéuticos y las aplicaciones médicas; 2) las tendencias recientes de legalización, asociadas con el aumento de la base de consumidores y la reducción del estigma y el permiso para su uso con fines sociales, religiosos y culturales y 3) el aumento de las actividades de investigación y desarrollo para superar los efectos negativos del cannabis y la introducción de nuevas variaciones [1].

Dado el crecimiento de la investigación en la ciencia de la salud del *cannabis*, la investigación sobre microbiología vegetal y ciencia de los alimentos, la conexión subyacente del microbioma y la salud de las plantas con la calidad de las formulaciones/productos de cannabis en toda la cadena de valor ha cobrado impulso [2]. Además, estudios genómicos recientes sobre *Cannabis* también están construyendo conocimiento científico sobre la mejora y la producción, abordando principalmente la incertidumbre en la clasificación taxonómica de los dos taxones principales, así como el comportamiento dioico de la especie y su impacto en el desarrollo de las flores [3, 4].

En este marco, las pruebas basadas en ADN, ya sea a través de PCR en tiempo real, PCR digital o secuenciación de nueva generación (*Next Generation Sequencing* NGS) han cobrado impulso en los últimos años, principalmente debido a la alta sensibilidad y los resultados rápidos. Estas tecnologías hacen uso de las moléculas universales de ADN/ARN, presentes en todos los organis-

mos vivos, para evaluar las principales fuentes de contaminantes microbianos y ayudar en la determinación del sexo de las plantas de *Cannabis sativa*, solo por mencionar algunas aplicaciones.



Contaminación microbiana

La contaminación microbiana es una de las principales preocupaciones de los productores de *cannabis*. Mientras la presencia de patógenos humanos en las formulaciones de *cannabis* supone un grave riesgo para la seguridad de los consumidores, la infección por patógenos vegetales puede dificultar la producción introduciendo importantes pérdidas económicas.

Los cogollos de la inflorescencia del *cannabis* suelen estar contaminados con mohos y micotoxinas, especialmente aflatoxinas y ocratoxinas producidas por *Aspergillus* spp. [5]. A pesar de que los métodos para controlar las micotoxinas son en su mayoría preventivos durante la producción, se espera que la presencia de patógenos fúngicos y micotoxinas relacionadas aumente con la escala de las producciones de *cannabis*, tanto en condiciones de invernadero como de campo. Los problemas causados por mohos específicos se amplifican en condiciones de invernadero/cerradas, mientras que en la producción en campo abierto surgen problemas microbianos principalmente debido

a hongos fitopatógenos y micotoxigénicos asociados al cambio climático [2]. Independientemente del modo de producción, los contaminantes microbianos en las preparaciones de cannabis pueden inducir graves

consecuencias para la salud, especialmente en personas con sistemas inmunológicos deprimidos. A modo de ejemplo, la acumulación de esporas de *Aspergillus* en los pulmones, conocidas como aspergilosis pulmonar, representaron el 43% de las infecciones fúngicas entre los consumidores de cannabis [6]. El difícil diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades refuerza la necesidad de prevenir el establecimiento de mohos

en los sistemas de producción de *Cannabis* [2]. Además, también se han registrado varios informes de contaminación bacteriana patógena. En estos casos, *E. coli* y *Salmonella* spp. fueron los contaminantes bacterianos más reportados, por lo que también vale la pena analizar estas especies durante la producción y en toda la cadena de valor del cannabis [5].

Además de los patógenos humanos, la mayoría de los informes sobre patógenos de plantas que afectan la producción también están asociados con patógenos fúngicos de plantas, seguidos de virus o viroides, que pueden comprometer toda una producción si no se detectan y abordan rápidamente [7]. Desde el punto de vista económico, *Botrytis Cinerea* y *Erysiphe* spp. son actualmente los patógenos de Cannabis más impactantes en todo el mundo [5]. También afecta a varias otras plantas huésped, que pueden actuar como reservorios de inóculo, *B. cinerea* provoca moho gris, que daña los brotes y tallos florales. *Erysiphe* spp. son patógenos obligados descritos como los agentes causantes del oídio (PM) en varias cucurbitáceas que

atacan hojas y yemas. Entre los patógenos virales, informes recientes indican la aparición de diferentes agentes, siendo el virus de la clorosis de la lechuga (LCV), el virus de la remolacha (BCTV) y el viroide latente del lúpulo (HLVd) como las peores amenazas para la producción, debido a los síntomas graves y la facilidad de dispersión^[8].

En este contexto, además de los métodos de enumeración dependientes del cultivo de referencia, se requieren métodos independientes del cultivo, junto con mediciones cuantitativas de las toxinas microbianas y sus genes codificantes, para evaluar la carga microbiológica en cada etapa de la cadena de producción de *Cannabis*, ya sea para los patógenos humanos o para las plantas. El uso de métodos basados en PCR, como la PCR en tiempo real y la PCR digital, puede cambiar las reglas del juego, ya que permite obtener resultados altamente sensibles y más rápidos, en comparación con los métodos microbiológicos clásicos que pueden tardar semanas en proporcionar un resultado. Aunque es más costosa, la detección por PCR de estos patógenos puede suponer un gran ahorro, ya que se confía en ella para cribar rápidamente grandes volúmenes de muestra. Dado que la mayoría de las muestras son presuntamente negativas, será necesario utilizar métodos adicionales dependientes del cultivo en un volumen de muestras mucho menor. Además, la detección de patógenos endófitos como virus o viroides depende en gran medida de métodos moleculares para proporcionar resultados rápidos y fiables.

Además de la detección microbiana selectiva de una determinada especie fúngica o bacteriana, el uso de enfoques no dirigidos, como la secuenciación de nueva generación (NGS) ha demostrado ser una herramienta valiosa para la caracterización completa del microbioma de las plantas de cannabis, revelando la presencia no solo de patógenos vegetales y humanos, sino también de microbios beneficiosos como las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB). En estudios recientes, los enfoques combinados de NGS dirigidos a los ITS fúngicos y a los 16S bacterianos revelaron la presencia de varias especies bacterianas y fúngicas patógenas o toxigénicas en las muestras de plantas analizadas, entre ellas *Acinetobacter Baumannii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aspergillus spp.* y

Penicillium spp. [9, 10]. Del mismo modo, la técnica NGS se puede utilizar para evaluar el viroma de las plantas de cannabis, revelando interacciones complejas tanto en infecciones virales únicas como mixtas^[11].

Determinación del sexo de la planta

Al igual que varias otras especies con flores, *Cannabis Sativa* presenta variedades dioicas (flores femeninas y masculinas en plantas separadas) y monoicas (flores femeninas y masculinas en la misma planta individual), aunque para la mayoría de las aplicaciones generalmente prefieren variedades dioicas. De acuerdo con su propósito principal, se seleccionan plantas femeninas o masculinas, mientras que, para aplicaciones medicinales, se desean plantas femeninas, debido a la mayor producción de cannabinoides, para fines de producción y reproducción de fibra, las plantas masculinas son más valiosas, debido a su rápido crecimiento, mayor calidad de fibra y capacidad para polinizar plantas femeninas y producir flores con semillas^[12].

Sin embargo, el determinar el fenotipo del sexo es difícil en las plantas jóvenes. La identificación de las plantas macho se puede realizar a través de una inspección visual, una vez que los caracteres sexuales de la planta comienzan a ser visibles en forma de pre-flores masculinas, lo que ocurre alrededor de 3-4 semanas después de la germinación. Esta actuación es engorrosa y laboriosa, debiendo contar con profesionales calificados. Además, permitir que las plantas crezcan antes de eliminar los machos requiere un valioso espacio de cultivo adicional. Para superar estas limitaciones, la identificación de las plantas macho semanas antes de que el sexo de la planta se haga visible se puede realizar a través de métodos basados en el ADN, generalmente utilizando qPCR en tiempo real dirigida a secuencias de ADN en los cromosomas X e Y de las plantas [4, 13]. Al tomar muestras de un folíolo de cada planta unos días después de la germinación, se puede lograr rápidamente la determinación del sexo y las plantas macho se pueden rechazar con confianza, sin arriesgar la producción de flores femeninas ricas en cannabinoides.

Observaciones finales

Los métodos de biología molecular, como la PCR en tiempo real, la PCR digital y la secuenciación de nueva generación (NGS), son herramientas de vanguardia para la industria

del cannabis. Muy valiosos para evaluar la salud de las plantas, garantizar la gestión de la seguridad y el cumplimiento, ayudar en el fitomejoramiento y optimizar la producción, los métodos moleculares asumirán un papel clave al proporcionar información sobre la regulación y la formulación de políticas en constante evolución para los productos de cannabis.

Referencias

1. <https://www.expertmarketresearch.com/reports/cannabis-market>
2. Vujanovic, V., Korber, D., Vujanovic, S., Vujanovic, J. y Jabaji, S. (2020) Scientific Perspectives de la investigación sobre el microbioma del cannabis para garantizar la calidad y la seguridad de los productos. *Microorganismos* 8: 290.
3. Backer, R., Mandolino, G., Wilkins, O., ElSohly, M. y Smith, D. (2020) Editorial: Genómica, cría y producción de cannabis. *Frontiers de la Ciencia de las Plantas*. 11: 591445.
4. Barcaccia, G., Palumbo, F., Scariolo, F., Vannozzi, A., Borin, M. y Bona, S. (2020) Potenciales y desafíos de la genómica para la mejora de cultivares de cannabis. *Frontiers de la Ciencia de las Plantas*. 11: 573299.
5. Dryburgh, L., Bolan, N., Grof, C., Galetti, P., Lucas, C. y Martin, J. (2018) Contaminantes del cannabis: fuentes, distribución, toxicidad humana y efectos farmacológicos. *Revista Británica de Farmacología Clínica* 84: 2468.
6. Gwinn, K., Leung, M.C.K., Stephens, A.B. y Punja, Z.K. (2023) Contaminantes fúngicos y micotóxicos en flores de cannabis y cáñamo: implicaciones para la salud del consumidor e instrucciones para futuras investigaciones. *Frontiers de la Microbiología*. 14:1278189.
7. Punja, Z. K. (2021) Enfermedades emergentes de Cannabis sativa y manejo sostenible. *Ciencia del Manejo de Plagas*. 77: 3857.
8. Miotti, N., Passera, A., Ratti, C., Dall'Ara, M., Casati, P. (2023) Una guía para la virología del cannabis: de la investigación de Virome al desarrollo de herramientas biotecnológicas virales. *Virus*. 15: 1532.
9. McKernan, K., Spangler, J., Helbert, Y., Lynch, R. C., Devitt-Lee, A., Zhang, L., et al. (2016). Análisis metagenómico de muestras de cannabis medicinal: Las bacterias patógenas, los hongos toxigénicos y los microbios beneficiosos crecen en pruebas de levadura y moho basadas en cultivos. *F1000Investigación* 5:2471.
10. Sopovskis DS, Han J, Stevens-Riley M, Wang Q, Erickson BD, Oktem B, Vanlandingham M, Taylor CL y Foley SL (2023) Investigación de microorganismos en el cannabis después de calentarlo en un vaporizador comercial. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12:1051272.
11. Alcalá' Briseño RI, Batuman O, Brawner J, Cuellar WJ, Delaquis E, Etherton BA, French-Monar RD, Kreuzer JF, Navarrete I, Ogero K, Plex Sula' Al, Yilmaz S y Garrett KA (2023) Traducción de análisis de viroma para apoyar la bioseguridad, la gestión en la granja y el mejoramiento de cultivos. *Front. Plant Sci.* 14:1056603.
12. Torres, A., Pauli, C., Givens, R., Argyris, J., Allen, K., Monfort, A. y Gaudino, R. (2022) Métodos de alto rendimiento para identificar Cannabis sativa macho utilizando varios métodos de genotipado. *Diario de Investigación sobre el Cannabis*. 4:57.
13. Toth, J.A., Stack, G.M., Cala, A.R., et al. (2020) Desarrollo y validación de marcadores genéticos para el sexo y el quimiotipo cannabinoide en Cannabis sativa L. *GCB Bioenergía*. 12:213.