

Resumen

Cannabis sativa L. (Cannabaceae) es una especie angiosperma, alógama y dicotiledónea compuesta por variedades de día corto y día neutro que presentan ejemplares dioicos (machos y hembras), y plantas monoicas. Entre sus múltiples aplicaciones destacan tanto su uso industrial como su uso medicinal. A pesar de que el cannabis ha sido empleado por el ser humano desde tiempos ancestrales, y del creciente interés que ha despertado en investigadores de todo el mundo debido a su utilidad terapéutica, la psicoactividad que presentan algunas de sus variedades, derivada de su contenido en Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), ha motivado la prohibición de su cultivo durante casi sesenta años. La estricta fiscalización a la que ha sido sometido el cannabis, ha impedido que profesionales de todo el mundo puedan llevar a cabo programas de mejora genética de esta especie, lo que se ha traducido en la ausencia de variedades uniformes.

En esta Tesis Doctoral se han desarrollado diferentes herramientas biotecnológicas para la mejora genética del cannabis. En primer lugar, dada la falta de reproducibilidad de algunos protocolos de cultivo in vitro de cannabis y la gran influencia que el genotipo ejerce en la efectividad de los mismos, se evaluó la capacidad de regeneración in vitro de diferentes explantes. Como resultado, se ha desarrollado un protocolo libre de hormonas a partir de hipocótilos de *C. sativa* que presenta altas tasas de regeneración (las cuales oscilan del 32,26% al 71,15%) en todos los genotipos evaluados, presentando además un 17,94% de tasa de enraizado espontáneo de los regenerantes. A su vez, se ha estudiado el patrón polisomático de diferentes explantes de cannabis y se ha conseguido regenerar, a partir de los mismos, un porcentaje significativo de ejemplares mixoploides (17,65% procedentes de cotiledones y 13,33% de hipocótilos) que, tal y como describe la bibliografía existente, podrían mostrar una mayor capacidad de síntesis de cannabinoides.

Por otro lado, dada la ausencia de publicaciones científicas al respecto y el potencial que esta técnica presenta para paliar la variabilidad intrínseca de esta especie, se ha desarrollado el estudio más profundo hasta la fecha relativo a la biología floral masculina de *C. sativa*. Se han descrito hasta 476.903 microsporas y granos de polen por flor masculina, con tasas de viabilidad in vivo de las microsporas del 53,71 al 70,88%. Además, se han correlacionado todas las etapas de desarrollo del microgametofito con un marcador morfológico floral fácilmente medible como la longitud de la yema, identificando intervalos de longitud de yema que contienen mayoritariamente microsporas vacuoladas y granos de polen joven bicelular en todos los fenotipos evaluados. De este modo, y aunque la presencia de almidón en las microsporas y granos de polen de *C. sativa* sigue un patrón similar al observado en especies recalcitrantes a la androgénesis, ha sido posible abordar la inducción de la embriogénesis de microsporas en esta especie, consiguiendo producir por primera vez estructuras multicelulares derivadas de las microsporas tras aplicar sobre las yemas un pretratamiento de frío de una semana de duración.

Finalmente, como requisito previo para la edición genética de *C. sativa* mediante los sistemas Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)/Cas, y haciendo uso del protocolo de regeneración in vitro de plantas surgido de la presente Tesis Doctoral, se ha conseguido desarrollar por primera vez un protocolo para producir plantas de cannabis transformadas genéticamente de forma estable, lo que supone un hito histórico en la mejora genética de la especie. Después del cocultivo con *A. tumefaciens* y el posterior cultivo en medio de regeneración selectiva con antibióticos, los hipocótilos lograron respectivamente un 23,1% y un 5,0% de tasas de regeneración y transformación. En su conjunto, la presente Tesis Doctoral proporciona un abanico de herramientas biotecnológicas que permitirán el desarrollo de una

nueva generación de variedades de cannabis de alto rendimiento, que presenten caracteres homogéneos, resistentes a múltiples estreses tanto bióticos como abióticos, y siendo así aptas tanto para un uso industrial como medicina.