



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



Evaluación de cepas de *Trichoderma* para el control del moho gris (*Botrytis cinerea*) en el cultivo del cáñamo (*Cannabis sativa* L.) variedad Cherry Oregon Hemp

Vargas Quito, Jeanneth Patricia

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

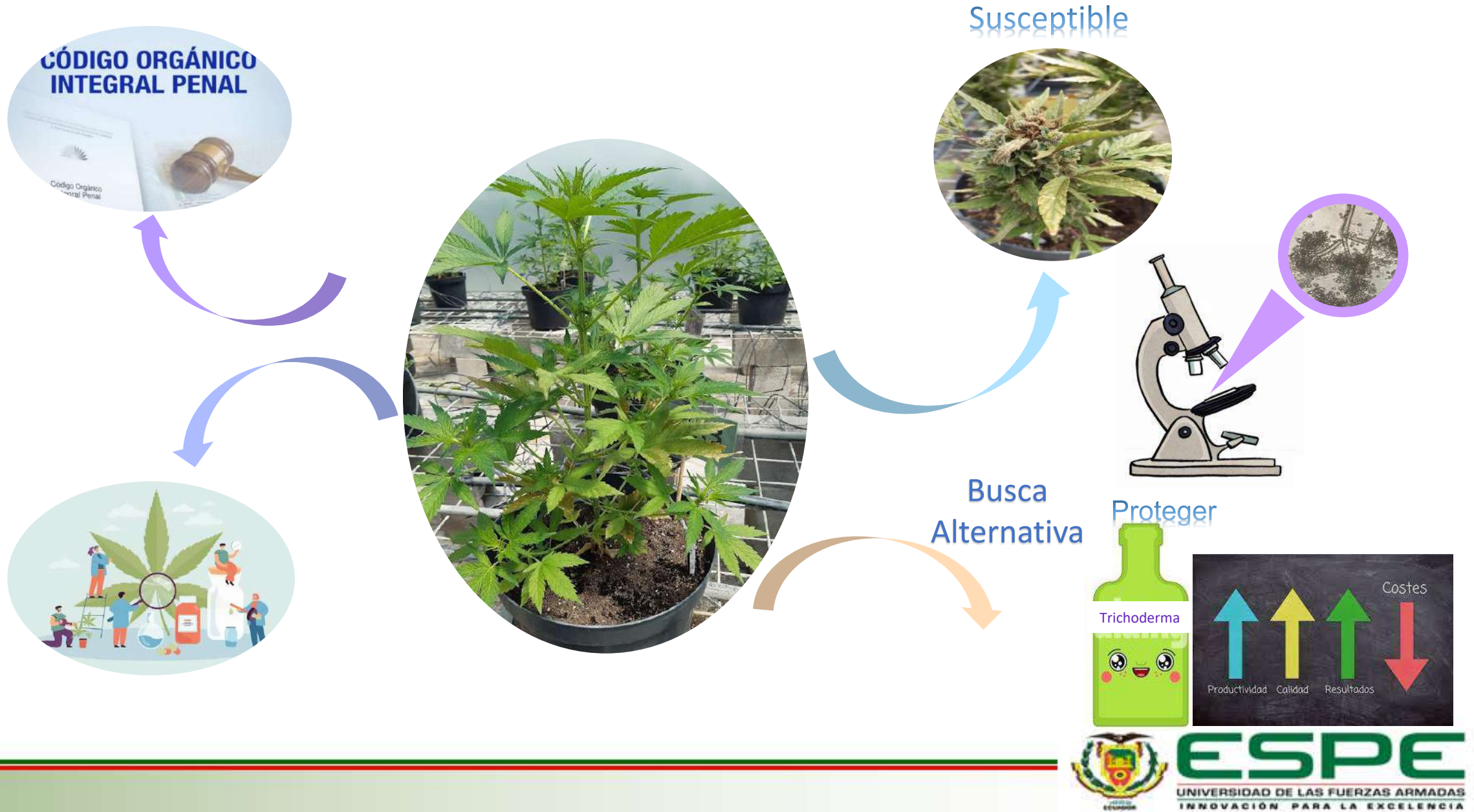
Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria

Ing. Landázuri Abarca, Pablo Aníbal, Mgtr.

02 de agosto del 2023



Introducción



Justificación



Ecuador

7 tipos de licencias para ejercer actividades con el Cannabis no Psicoactivo



En consecuencia



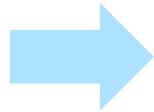
Ofrecer



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Objetivos

Objetivo general



- Evaluar cepas de *Trichoderma* para el control moho gris (*Botrytis cinerea*) en el cultivo del cáñamo (*Cannabis sativa* L.) variedad Cherry Oregon Hemp.

Objetivos específicos

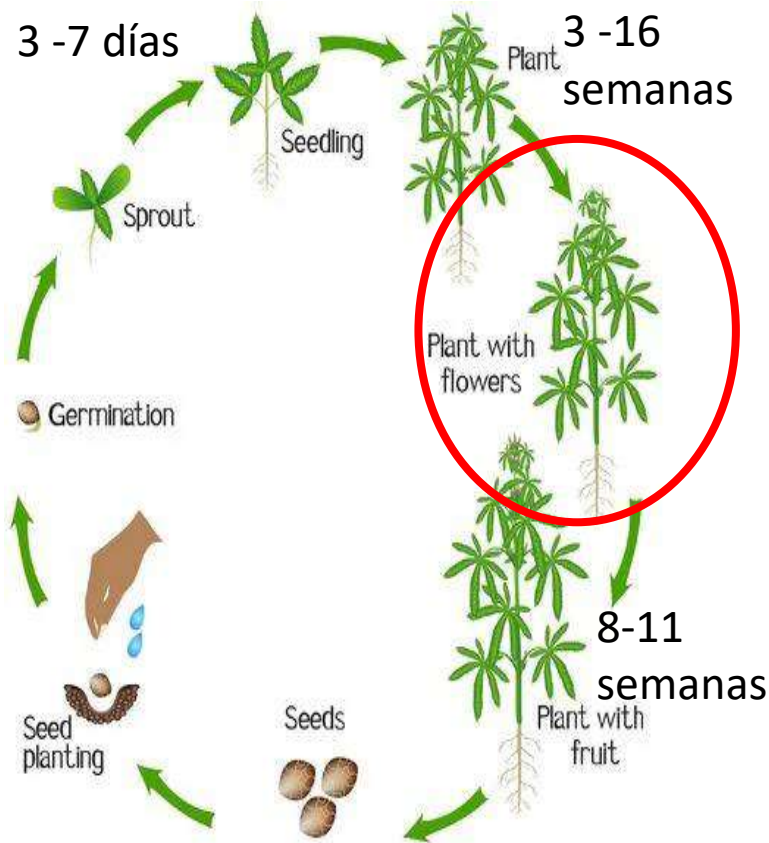


- Evaluar mediante pruebas de antagonismo *in vitro*, empleando seis cepas de *Trichoderma* spp. frente al fitopatógeno *Botrytis cinerea*.
- Evaluar bajo invernadero el potencial de las tres cepas de *Trichoderma* spp. para el manejo de *B. cinerea* en el cultivo de cáñamo, variedad Cherry Oregon Hemp.

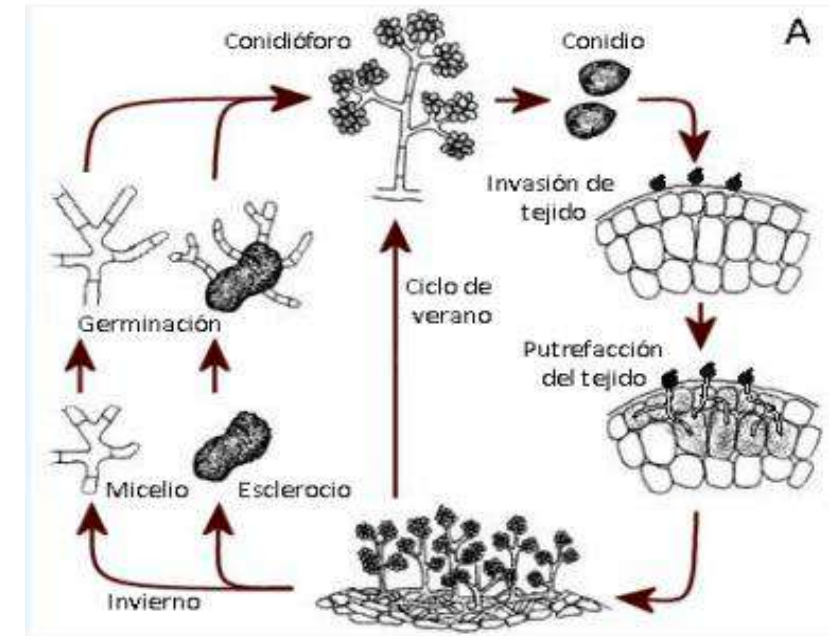


Marco Referencial

Cáñamo



Botrytis cinerea



Familia cannabáceas, **Género** *cannabis*, **Especie** *Cannabis sativa*
Carlos Linneo 1753.

(Thomas & ElSohly, 2016), (Lumbreras, 2017)

Marco Referencial

Control Biológico



- Efectivo, rentable
- Recomendado a largo plazo

Agente de control

Respuesta Inmunitaria

Crecimiento de las plantas

Reparación de suelos

Resistencia a sequias

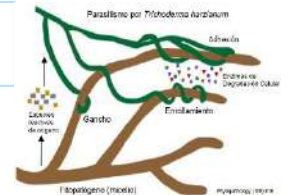
Trichoderma

Mecanismos de acción

Competencia

Antibiosis

Mico parasitismo

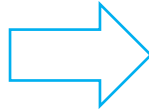


ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Metodología

Primera etapa

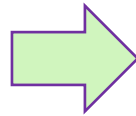
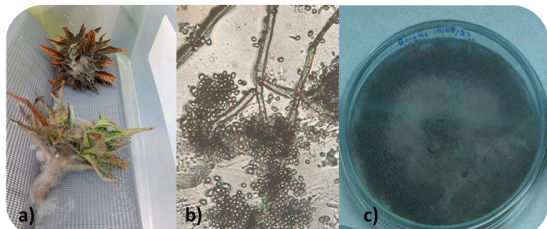
Ubicación del área de investigación



Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del INIAP, en el laboratorio de Control Biológico del Departamento de Protección Vegetal

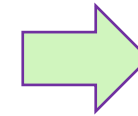
Aislamiento de *B. cinerea*

- 8 días presentar la esporulación.
- Incubación a 18°C por 5 días



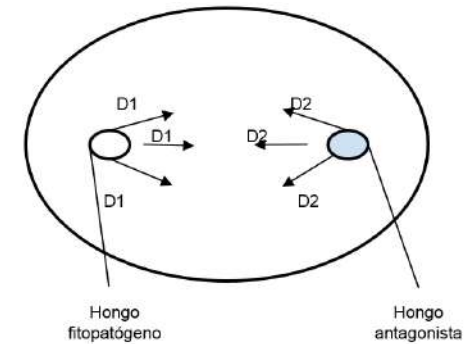
Multiplicación de *Trichoderma* spp.

- Medio PDA
- Incubación a 25°C



Pruebas de confrontación dual

- Inoculación disco 5 mm, distancia 2cm
- Testigos



Distribución de los tratamientos

Tratamiento	Cepa	Código
1	Cepa 1 <i>Trichoderma</i> spp.	C1
2	Cepa 2 <i>Trichoderma</i> spp.	C2
3	Cepa 3 <i>Trichoderma</i> spp.	C3
4	Cepa 4 <i>Trichoderma</i> spp.	C4
5	Cepa 5 <i>Trichoderma</i> spp.	C5
6	Cepa 6 <i>Trichoderma virens</i>	C6

Análisis estadístico

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

- Y_{ij} = efecto de la cepa antagonista
- μ = media general
- T_i = efecto de la i-enésima cepa de *Trichoderma*
- ε_{ij} = error experimental



Metodología

VARIABLES A EVALUAR

Porcentaje de inhibición



Se aplicando la fórmula de Fokkema (1973)

$$\% I = \frac{D1 - D2}{D1} * 100$$

%I= porcentaje de inhibición del crecimiento micelial
D1= diámetro del crecimiento micelial del testigo (mm)
Di= diámetro del crecimiento micelial del influenciado (mm)

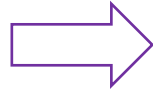
ESCALA DE ANTAGONISMOS PROPUESTA POR BELL ET AL. (1982)

Clase	Características
I	Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp., que cubrió toda la superficie del medio y redujo el crecimiento del patógeno.
II	Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp., que cubrió al menos 2/3 partes del medio.
III	<i>Trichoderma</i> spp., y fitopatógenos crecieron 1/2 y 1/2 la superficie del medio, uno no se sobrepuso al otro.
IV	Hongo patógeno creció al menos 2/3 partes del medio y resistió a la invasión de <i>Trichoderma</i> spp.
V	Crecimiento del patógeno que cubrió toda la superficie del medio.

Metodología

Segunda etapa

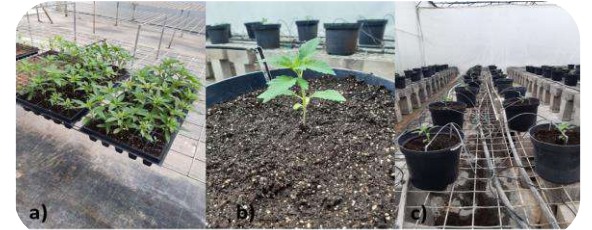
Ubicación del área de investigación



Invernadero automatizado INIAP – Sangolquí

Trasplante de las plántulas de cáñamo

- Sustrato turba, pomina y humus.
- Trasplante a los 30 días después de la germinación



Multiplicación masiva en sustrato de arroz

- 1 cm² aprox. del agar colonizado con el hongo seleccionado.
- Incubación 24°C, durante 6 días.



Aplicación del inóculo de *B. cinerea* en las plantas

- Reactivación *B. cinerea*.
- Concentración de 1x10⁵ conidios ml⁻¹

Aplicación de los tratamientos

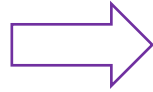
- Lavado del sustrato de arroz.
- Concentración de 1x10⁶ conidios ml⁻¹



Metodología

Segunda etapa

Ubicación del área de investigación



Invernadero automatizado INIAP, Hacienda el Prado, Sangolquí

Distribución de los tratamientos en la etapa de campo

Tratamiento	Cepa	Código
1	Cepa 1 <i>Trichoderma</i> spp.	T1
2	Cepa 6 <i>Trichoderma virens</i>	T2
3	Cepa 3 <i>Trichoderma</i> spp.	T3
4	Testigo enfermo sin control	T4

Análisis estadístico:

Dispuestos DCA cuyo modelo matemático es el siguiente:

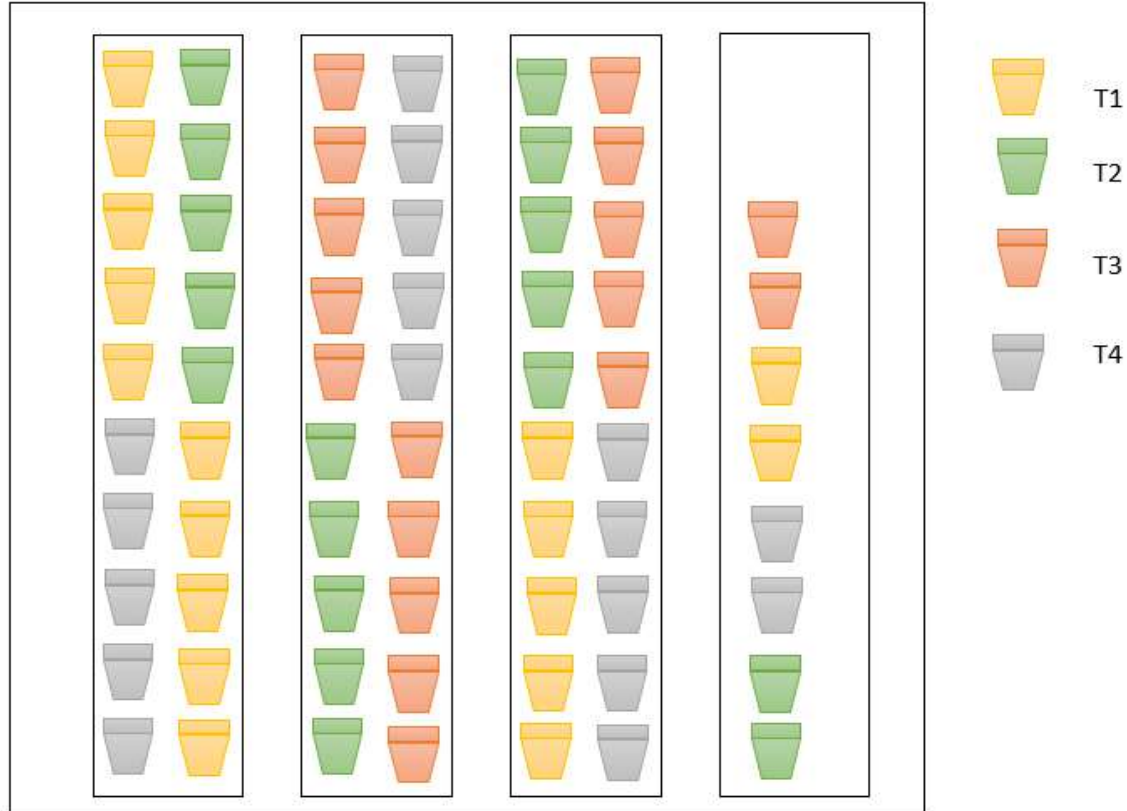
$$Y_{ij} = \mu + A_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

- Y_{ij} = efecto del biocontrolador
- μ = media general
- T_i = efecto de la i-enésima cepa de biocontrolador
- ε_{ij} = error experimental



Croquis experimental



Nota. T1 (Cepa 1 *Trichoderma* spp.); T2 (Cepa 6 *Trichoderma virens*); T3 (Cepa 3 *Trichoderma* spp.); T4 (Testigo enfermo con *Botrytis cinerea*)

Metodología

Variables agronómicas

Altura



Peso seco de la raíz



Peso seco de las inflorescencias (cogollos)



Metodología

Variables a evaluar

Incidencia

$$\text{Indicencia (\%)} = \frac{\text{Nro de plantas u \u00f3rganos afectados}}{\text{Nro total de plantas analizadas}} \times 100$$

Severidad

$$\text{Severidad} = \left(\frac{\text{\u00c1rea afectada}}{\text{\u00c1rea total}} \right) \times 100$$



Escala de severidad

Grado 0	Sin evidencia sintomatol\u00f3gica de <i>B. cinerea</i>
Grado 1	Aparici\u00f3n de sintomatolog\u00eda de <i>B. cinerea</i> afectando al menos de c\u00e1liz floral.
Grado 2	Presencia de s\u00edntomas de <i>Botrytis cinerea</i> mayor 1% - menor o igual 5% del cogollo.
Grado 3	Presencia de s\u00edntomas de <i>Botrytis cinerea</i> mayor 5% y menor a 20% del cogollo
Grado 4	Presencia de s\u00edntomas de <i>Botrytis cinerea</i> mayor o igual al 20% del cogollo

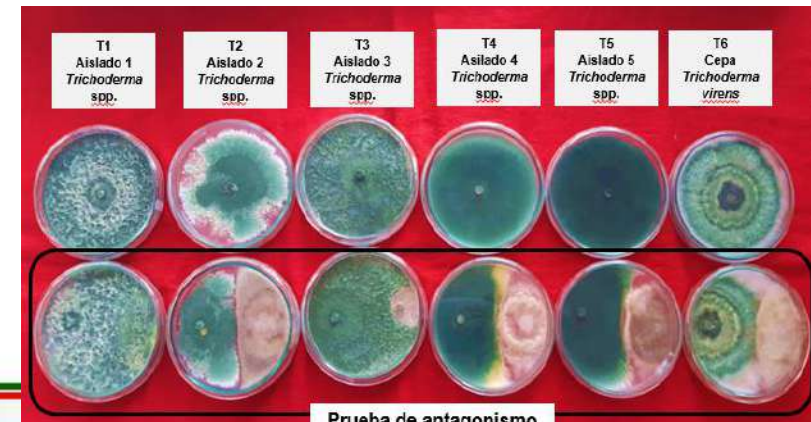
Resultados y Discusión

Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial

Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma* spp., para el control in vitro de *B. cinerea*.

Tratamientos	gl	% de inhibición	F	p-valor
Cepa 2 <i>Trichoderma</i> spp. (T2)	1	11,90 ± 2,17 c	37,94	<0,0001
Cepa 4 <i>Trichoderma</i> spp. (T4)	1	18,86 ± 2,83 b		
Cepa 5 <i>Trichoderma</i> spp. (T5)	1	18,23 ± 3,28 b		
Cepa 6 <i>Trichoderma virens</i> (T6)	1	21,52 ± 3,63 b		
Cepa 3 <i>Trichoderma</i> spp. (T3)	1	26,08 ± 2,00 a		
Cepa 1 <i>Trichoderma</i> spp. (T1)	1	27,97 ± 3,60 a		

Acosta et al., (2021) realizaron pruebas duales con cepas nativas *Trichoderma* spp. frente a *Botrytis* sp. donde indica que una cepa presentó un menor grado de inhibición como fue el caso de *T. harzianum* (MCHT07) con 6.81 % inferior al resto.



Prueba de antagonismo

Resultados y Discusión

Variables agronómicas

Variables agronómicas con el uso de cepas de Trichoderma spp., para el cultivo de cáñamo

Fuentes de variación	Altura	Diámetro del tallo
P-valor	*	-
F	3,87	2,25
T1	63,75 ± 7,26 ab	0,79 ± 0,08 a
T2	67,36 ± 11,13 a	0,86 ± 0,13 a
T3	58,39 ± 9,52 ab	0,84 ± 0,08 a
T4	54,64 ± 13,86 b	0,78 ± 0,09 a

Nota: Tratamiento 1 (Cepa 1 *Trichoderma* spp.);
Tratamiento 2 (Cepa 6 *Trichoderma virens*);
Tratamiento 3 (Cepa 3 *Trichoderma* spp.);
Tratamiento 4 (Testigo sin control). Los valores en la columna seguidos por una letra presentan diferencias significativa ($P < 0,05$)

(Candelero et al., 2015) Estudio diferentes especies de *Trichoderma* como promotoras de crecimiento en plántulas de ají, en la que usan *Trichoderma virens* y obtuvieron promedios mayores en el crecimiento

(Hoyos-Carvajal et al., 2009) Crecimiento y estimulación en frijol con *Trichoderma* donde evaluó 101 cepas, mostro puede producir efectos positivos, nulos o incluso negativos, con lo que concuerda con el tratamiento 3



Resultados y Discusión

Fuentes de variación	Biomasa radicular			Rendimiento
	Peso fresco	Peso seco	%Materia seca	
P-valor	*	*	*	*
F	6,52	10,42	9,01	6,59
T1	34 ± 23,51 a	14,60 ± 9,95 a	44,18 ± 9,21 b	55,06 ± 4,77 a
T2	31 ± 10,3 ab	18,84 ± 8,16 a	59,26 ± 11,74 a	55,04 ± 11,18 a
T3	14,43 ± 7,87 c	5,89 ± 2,80 b	42,85 ± 10,77 b	50,52 ± 7,36 a
T4	17,41 ± 9,54 bc	7,43 ± 5,11 b	41,34 ± 9,57 b	37,1 ± 17,99 b

Nota: Tratamiento 1 (Cepa 1 *Trichoderma* spp.); Tratamiento 2 (Cepa 6 *Trichoderma virens*); Tratamiento 3 (Cepa 3 *Trichoderma* spp.); Tratamiento 4 (Testigo sin control). Los valores en la columna seguidos por una letra presentan diferencias significativa (P<0,05)

(Contreras-Cornejo et al., 2009), muestran que la cepa de *Trichoderma virens* presentan características fenotípicas relacionadas con las auxinas ayudan a la producción de biomasa y a un desarrollo de las raíces laterales

(Kakabouki et al., 2021), en su estudio sobre la colonización de *Trichoderma harzianum* sobre el desarrollo, crecimiento y el contenido de CBD del cáñamo (*Cannabis sativa* L.), en la cual nos presenta que no hubo diferencias significativas en el rendimiento aplicando pero entre variedades existió diferencias.



Resultados y Discusión

Incidencia y severidad

Porcentaje de incidencia y severidad de *B. cinerea* evaluada entre tratamientos

Fuentes de variación	Incidencia	Severidad
P-valor	*	*
F	13,64	5,55
T1 (Aislado 1 <i>Trichoderma</i> spp.)	1,11 ± 1,14 b	3,21 ± 5,04 b
T2 (Cepa <i>Trichoderma virens</i>)	1,12 ± 1,19 b	7,12 ± 7,39 ab
T3 (Aislado 3 <i>Trichoderma</i> spp.)	0,51 ± 0,91 b	1,37 ± 2,90 b
T4 (Testigo sin control)	3,74 ± 2,37 a	9,49 ± 7,63 a

Nota. Letras distintas indican diferencia significativa ($p > 0,05$).

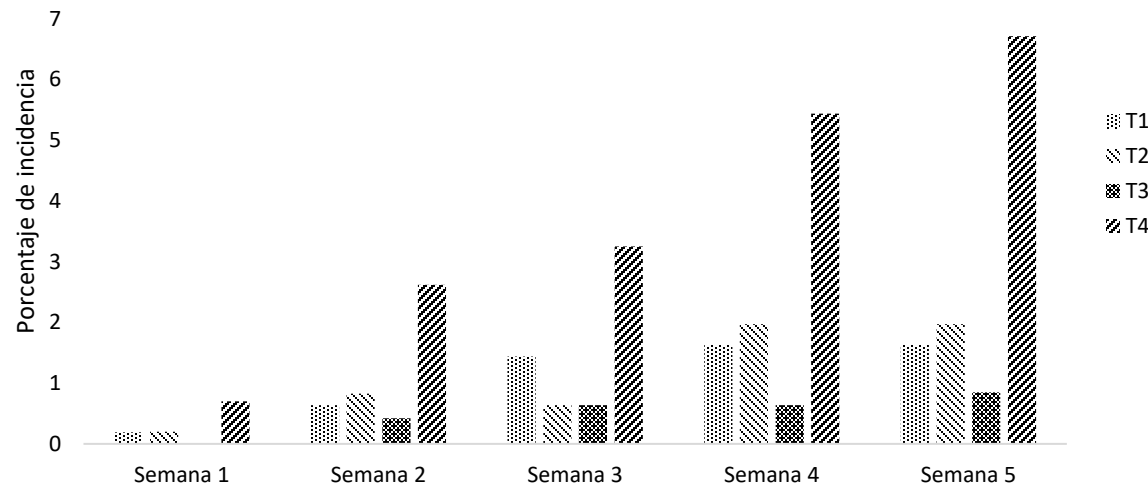
Silva & Sandoval, (2004), menciona que utilizaron diferentes tipos de cepas *Trichoderma* spp. para controlar a *B. cinerea* en *Leucadendron*, algunas de las cepas no presentaron ser un buen biocontrolador sin embargo, cuando usaron la cepa de *Trichoderma virens* presentaron un menor control

Los tratamientos presentaron un control de la enfermedad similar en la incidencia, sin embargo T3 presentó menor severidad con respecto a los demás tratamientos

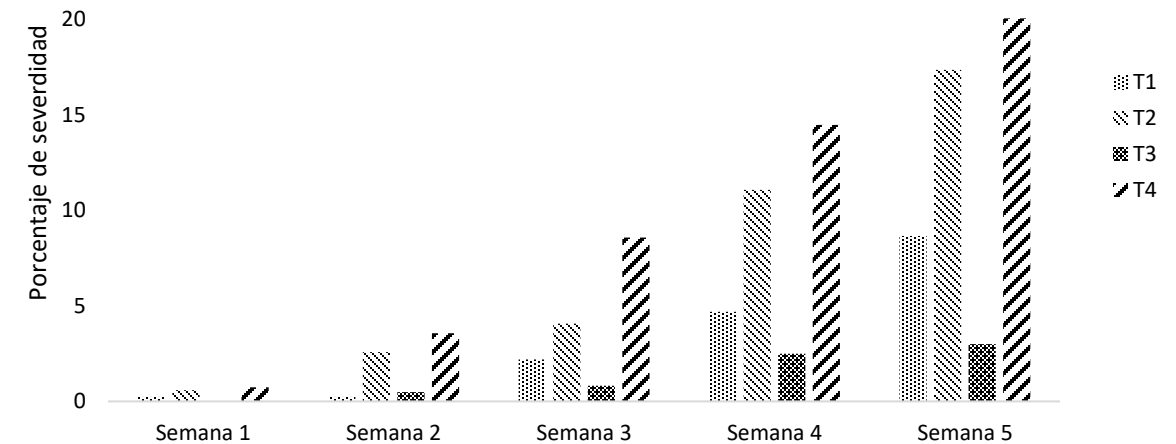


Resultados y Discusión

Porcentaje de incidencia de *B. cinerea* por efecto del uso de cepas de *Trichoderma* evaluada entre tratamientos por semana



Porcentaje de severidad de *B. cinerea* por efecto del uso de cepas de *Trichoderma* evaluada entre tratamientos por semana

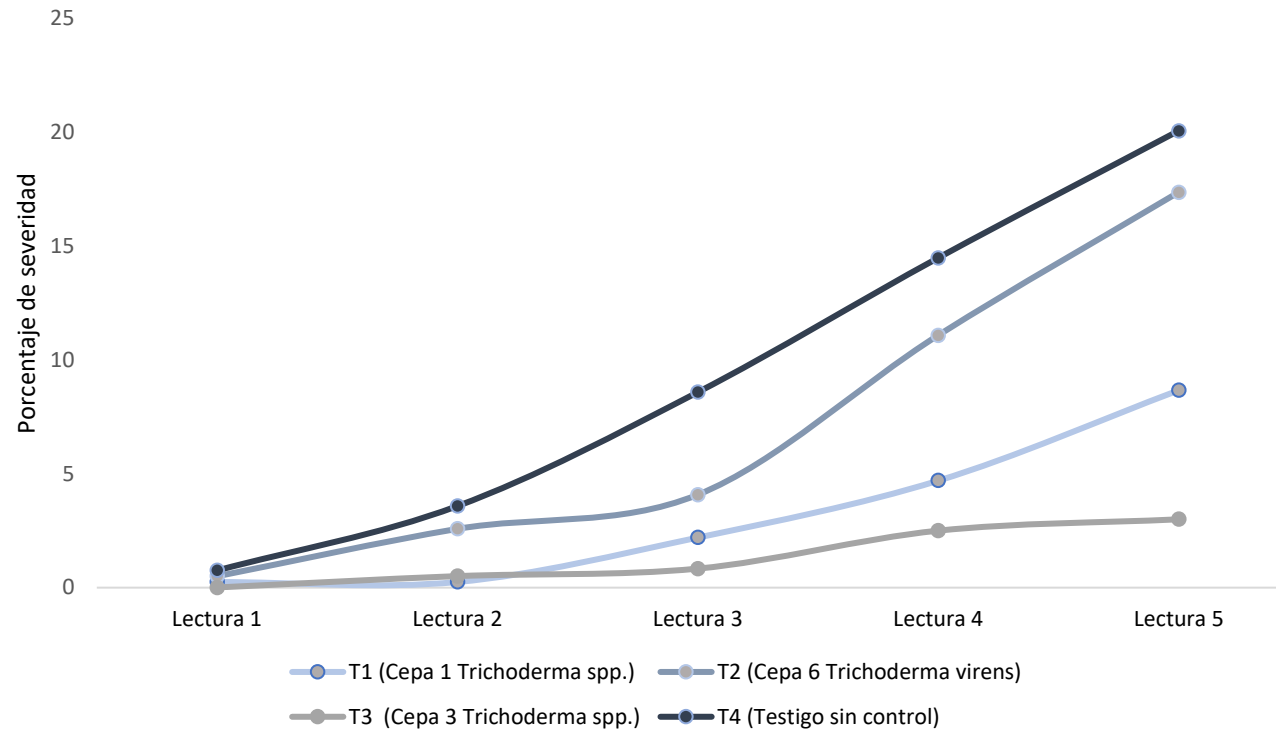


Nota. Tratamiento 1 (Cepa 1 *Trichoderma* spp.); Tratamiento 2 (Cepa 6 *Trichoderma virens*); Tratamiento 3 (Cepa 3 *Trichoderma* spp.); Tratamiento 4 (Testigo sin control).

(O'Neill et al., 1996). Asimismo en otro estudio indicaron que al emplear cepas de *Trichoderma harzianum* y *lignorum* en fresa tuvieron una incidencia menor sobre *B. cinerea* en comparación con el tratamiento químico.

Resultados y Discusión

Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) por efecto de las cepas *Trichoderma* en los tratamientos



Nota. Tratamiento 1 (Cepa 1 *Trichoderma* spp.); Tratamiento 2 (Cepa 6 *Trichoderma virens*); Tratamiento 3 (Cepa 3 *Trichoderma* spp.); Tratamiento 4 (Testigo sin control).



Conclusiones

- Al evaluar las cepas de *Trichoderma* mostraron un efecto antagónico sobre *B. cinerea*, destacando las cepas C1, C3 quienes registraron un índice de antagonismo tipo 1 cubriendo toda la superficie del medio y reduciendo el crecimiento del patógeno, mientras que para las cepas C4, 5, 6 presentaron un índice de antagonismo tipo 2 cubriendo 2/3 del medio y finalmente con menos efecto fue la cepa C2 que creció la mitad de la superficie sin sobreponerse al patógeno.
- De las cepas seleccionadas la incidencia y severidad de *B. cinerea* en cañamo se encontró una disminución con respecto al testigo, en el grado de incidencia no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados con *Trichoderma* spp. Sin embargo, con respecto a la severidad se destacó el tratamiento T3 (Cepa 3 *Trichoderma* spp.), presentando un grado 2 con una disminución de síntomas de *Botrytis cinerea* entre 1 al 5% en el cogollo

Conclusiones

- Las plantas de cáñamo aplicadas, con los tratamientos de *Trichoderma* no presentaron diferencias significativas con respecto al rendimiento sin embargo, los tratamientos 1, 2 alcanzaron los mejores promedios de peso de cogollos.
- El tratamiento T2 (Cepa 6 *Trichoderma virens*), presentó una mayor altura, así como también en el peso fresco, peso seco y porcentaje de materia seca de raíz que los tratamientos T1 (Cepa 1 *Trichoderma* spp.) y T3 (Cepa 3 *Trichoderma* spp.).

Recomendaciones

- Se recomienda para el control de *Botrytis cinerea* en cáñamo el tratamiento 3 (Cepa 3 *Trichoderma* spp.) ya que disminuyó la incidencia y severidad de la pudrición del cogollo.
- Se recomienda realizar otro tipo propagación para *Trichoderma*, las cuales cumplan con los requerimientos nutricionales para su crecimiento y desarrollo.
- Se recomienda evaluar el uso del tratamiento 3 (Cepa 3 de *Trichoderma* spp.) con diferentes concentraciones, durante las etapas de prefloración y floración.
- Se recomienda realizar una combinación de los tratamientos 3, 2 debido a que el tratamiento 3 mostró gran capacidad para control de *Botrytis cinerea* y el tratamiento 2 mejoró las características agronómicas de la planta de cáñamo.

Agradecimientos



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



Ing. Pablo Landázuri
Ing. Cristina Tello
Ing. Jorge Merino
Ing. Pablo Jaramillo
Ing. Juan Tigrero
Doc. Patricio Pérez
Doc. César Falconí



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA