

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

**CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE *Neofusicoccum Parvum* ASOCIADOS
AL CANCRO DE TALLOS Y RAMAS EN *Cannabis Sativa* L. En URUGUAY**

por

Elvis Joaquín SASIA AYSA

**Trabajo final de grado presentado como
uno de los requisitos para obtener el título
de Ingeniero Agrónomo**

MONTEVIDEO

URUGUAY

2023

Trabajo final de grado aprobado por:

Director: _____

Ing. Agr. Elisa Silvera Pérez (Msc, DSc)

Ing. Agr. Pablo González Rabelino (Mag)

Ing. Agr. Águeda Scattolini (Mag)

Fecha: 27 de enero de 2023

Autor: _____

Elvis Joaquín Sasía Aysa

AGRADECIMIENTOS

Al vivero Sietekannas por brindarme los plantines para realizar el trabajo.

Al Ing. Agr. Pablo González por la atención a la hora de comenzar con el trabajo de tesis.

A la Ing. Agrónoma Elisa Silvera por su constante apoyo y atención desde los inicios y durante todo el trabajo de tesis; desde la enseñanza del funcionamiento del laboratorio en general, pasando por las técnicas de laboratorio, hasta la obtención de los materiales para el desarrollo del trabajo.

A la Ing. Agr. Águeda Scattolini por estar a la orden y por la ayuda con el programa DinoCapture 2.0 para la medición de conidios

Al grupo del laboratorio de Fitopatología por siempre estar dispuestos a brindar su ayuda.

Al compañero Guzmán Rousserie y Damián Collazo por la ayuda brindada.

A mi familia por el apoyo incondicional constante durante toda la etapa académica.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO DE <i>Cannabis sativa</i> L	2
2.1.1. Usos y diferenciación de <i>Cannabis sativa</i>	4
2.1.2. Mercado de <i>Cannabis</i> a nivel mundial y regional	4
2.1.3. Importancia del cultivo en Uruguay	5
2.2. PRINCIPALES ENFERMEDADES FÚNGICAS QUE AFECTAN EL CULTIVO DE <i>Cannabis sativa</i>	6
2.2.1. Moho gris	6
2.2.2. Cancro del cáñamo	6
2.2.3. Damping off	7
2.2.4. Mancha amarilla de la hoja	7
2.2.5. Podredumbre de raíz y tallo	8
2.2.6. Mancha marrón de la hoja y cancro del tallo	8
2.2.7. Mildiu	9
2.2.8. Cancro del tallo por <i>Fusarium</i>	9
2.2.9. Podredumbre radicular o del pie	10
2.2.10. Marchitamiento por <i>Fusarium</i>	10
2.3. TIZÓN EN CANNABIS	10
2.4. CANCRO DE TALLOS Y RAMAS CAUSADO POR BOTRYOSPHAERiaceae	11
2.4.1. Descripción taxonómica y morfológica	11
2.4.2. Síntomas en cannabis	12

2.4.3. Ciclo de la enfermedad	13
2.4.4. Manejo de la enfermedad.....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA	15
3.1.1. Características de las colonias	15
3.1.2. Características de los conidios	16
3.2. PRUEBA DE PATOGENICIDAD	16
3.3. RE-AISLAMIENTO	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA	19
4.2. PRUEBA DE PATOGENICIDAD	22
5. CONCLUSIONES	27
6. RESUMEN.....	28
7. SUMMARY	29
8. BIBLIOGRAFÍA	30
9. ANEXOS	34

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
Cuadro No. 1. Origen de los aislados utilizados.	15
Cuadro No. 2. Largo y ancho de conidios de los tres aislados de <i>N. parvum</i>	21
Cuadro No. 3. Incidencia del tizón de en tallo en plantas de cannabis inoculadas con aislados de <i>N. parvum</i>	22

Figura No.	Página
Figura No. 1. Morfología de la planta de <i>Cannabis sativa</i>	3
Figura No. 2. Inoculación de <i>N. parvum</i> . en planta de cáñamo de la variedad Fenochis.	17
Figura No. 3. Colonia del aislado Cluc F de <i>N. parvum</i> . en anverso y reverso de la placa en medio PDA después de tres (A-B), ocho (C-D) y 16 (E-F) días de incubación.	19
Figura No. 4. Colonia del aislado Migues 1 de <i>N. parvum</i> . en anverso y reverso de la placa en medio PDA después de tres (A-B), ocho (C-D) y 16 (E-F) días de incubación.	20
Figura No. 5. Colonia del aislado Migues 14 de <i>N. parvum</i> . en anverso y reverso de la placa en medio PDA después de tres (A-B), ocho (C-D) y 16 (E-F) días de incubación.	20
Figura No. 6. Cultivo de aislado Cluc F en medio AA con acículas de pino (A) y conidios observados en microscopio óptico con aumento 40X (B).	21
Figura No. 7. Necrosis en plantas del bloque tres inoculadas con aislados de <i>N. parvum</i> , Cluc F (A), Migues 1 (B) y Migues 14 (C) siete días post inoculación.	23
Figura No. 8. Picnidios en tallo por encima de la lesión en planta inoculada con <i>N. parvum</i>	23
Figura No. 9. Tratamientos testigos de los diferentes bloques.	24
Figura No. 10. Conidios de aislados Cluc F (A), Migues 1 (B) y Migues 14 (C) extraídos de picnidios de planta inoculada observado en microscopio óptico con aumento 40X.	25
Figura No. 11. Colonias de aislado Cluc F (A), Migues 1 (B) y Migues 14 (C), anverso de placa en medio PDA después de tres días de incubación.	25

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de Cannabis (*Cannabis sativa* L.) en Uruguay es un cultivo emergente, el cual se ha extendido por la gran mayoría de los departamentos del territorio nacional, teniendo una mayor influencia en la zona sur y este del país.

El sector abarca alrededor de 456 hectáreas a cielo abierto y unos 90000 m² de cultivo protegido, empleando directamente a más de 1070 trabajadores de todo el país (IRRCA, 2021, Uruguay XXI, 2021).

El cultivo puede ser afectado por diferentes agentes patogénicos como virus, bacterias, nematodos, hongos y pseudo hongos, como también por agentes abióticos. Según la revisión bibliográfica realizada por McPartland (1992) determinó que existe un total de 88 especies fúngicas capaces de afectar el cultivo. Dentro de las especies fúngicas se identificó a *Dendrophoma marconii* y *Botryosphaeria marconii* como agentes causales del cancro de tallos y ramas (McPartland et al., 2000) y recientemente ha sido identificado a *Neofusicoccum parvum* dentro de la familia *Botryosphaeriaceae* como otro agente causal del cancro de tallos y ramas en cannabis (Alberti et al., 2018, Feng et al., 2020).

En Uruguay entre el año 2018 y 2019 durante un relevamiento de enfermedades y plagas realizado en cultivos de *C. sativa* de los departamentos de Canelones y Montevideo (Rousserie y Collazo)¹ se realizaron aislamientos de plantas con síntomas y signo de tizón, siendo identificados molecularmente como *N. parvum*.

La identificación del agente causal del cancro de tallos y ramas en cannabis es de suma importancia para tomar medidas de manejo y control de la enfermedad.

A nivel país se desconocen las características morfológicas y la patogenicidad de los aislados de *N. parvum* asociados al cancro de tallos y ramas en *C. sativa*. Este estudio plantea como objetivo caracterizar los aislados de *N. parvum* mediante análisis morfológico y de patogenicidad en plantas de *C. sativa*.

¹ Rousserie, G.; Collazo, D. 2018. Prospección de enfermedades y plagas asociadas a los cultivos de Cannabis (sin publicar).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO DE *Cannabis sativa* L

Cannabis sativa L, también conocida como cáñamo o cannabis, es una especie originaria de Asia, perteneciente a la familia de las *Cannabaceae*. Fue clasificada taxonómicamente por primera vez en el año 1753 por el científico sueco Carl Linnaeus (Fassio et al., 2013, Small, 2015).

Se trata de una especie herbácea, anual, dioica, de polinización anemófila, que puede alcanzar una altura de hasta cuatro metros, posee un tallo erecto, hojas palmadas y estipuladas con peciolo de hasta siete centímetros de largo, compuestas con tres a nueve folíolos angostos de borde aserrado y de ápice agudo. El haz de la hoja está cubierto de tricomas glandulares, además posee un color más oscuro que el envés. Las inflorescencias son axilares, siendo las masculinas ramificadas y laxas, con muchas flores, mientras que las femeninas son densas pero con pocas flores (cinco a ocho). Las flores masculinas tienen pedicelo, con perianto de cinco sépalos; las femeninas son sésiles, con un perianto entero, membranáceo y adherido al ovario, el cual posee un solo óvulo y dos estigmas. El fruto es un aquenio, el cual posee forma ovoide y algo comprimido generalmente blanco, o verdoso teñido de color púrpura, envuelto por el perianto (Small y Cronquist, 1976).



- | | |
|--|--|
| A Inflorescencia de la planta masculina (estaminada) | 7 Flor pistilada en la que se aprecia el ovario (sección longitudinal) |
| B Planta femenina (pistilada) con fruto | 8 Semilla (aquenio1*) con bráctea |
| 1 Flor estaminada | 9 Semilla sin bráctea |
| 2 Estambre (antera y filamento corto) | 10 Semilla (vista lateral) |
| 3 Estambre | 11 Semilla (sección transversal) |
| 4 Granos de polen | 12 Semilla (sección longitudinal) |
| 5 Flor pistilada con bráctea | 13 Semilla sin pericarpio (pelada) |
| 6 Flor pistilada sin bráctea | |

Figura No. 1. Morfología de la planta de *Cannabis sativa*.

Fuente: tomado de UNODC (2010).

2.1.1. Usos y diferenciación de *Cannabis sativa*

El cannabis ha sido utilizado por el hombre por miles de años, es una de las especies vegetales más antiguas, siendo fuente de alimento, medicamentos y fibra, además en el último siglo ha tomado importancia su uso con fines recreativos dado su poder psicoactivo (Chandra et al., 2016).

Gracias a la diversidad natural dentro del género, y a la intervención del ser humano, las distintas especies difieren en características estructurales y químicas, siendo distintas las variedades cultivadas para la obtención de fibra a las cultivadas con fines medicinales. Por lo general las variedades utilizadas para la obtención de fibra se tratan de especies de gran altura, no ramificadas, siendo conocidas con el nombre de cáñamo al igual que las variedades cultivadas para la producción de semillas como alimento. Las especies cultivadas con fines recreativos y medicinales se tratan de plantas femeninas, ramificadas, las cuales han sido seleccionadas y cultivadas para producir una mayor cantidad de flores (Chandra et al., 2016).

La composición química y estructural de las especies varía, y determina su uso por parte del ser humano para satisfacer sus necesidades. Dentro de la composición química hay que hacer hincapié en los compuestos terpenofenólicos (fitocannabinoides) presentes de forma natural y en distintas concentraciones dependiendo la especie. Según estudios realizados, hasta el momento se han reportado 120 fitocannabinoides, de los cuales el más conocido y estudiado por ser el principal componente responsable de los efectos psicoactivos es el tetrahidrocannabinol, más conocido como THC. Este componente al igual que los demás fitocannabinoides se encuentra en mayor abundancia en el tejido floral, más específicamente en los tricomas glandulares de flor, el cual en las variedades modernas de uso recreativo y medicinal supera el 20% del peso seco (Chandra et al., 2016).

El cannabidiol o CBD es otro de los fitocannabinoides más conocido; se trata de un compuesto no psicoactivo, con propiedades desde el punto de vista farmacéutico dado sus propiedades antioxidantes, antiinflamatoria, anticonvulsivas, ansiolíticas, neuroprotectoras y antibióticas. Por lo general se encuentra en concentraciones de 2% o menos del peso seco del tejido vegetal floral, siendo el cannabinoide más abundante en cultivos de fibra y semillas (Small, 2015, Chandra et al., 2016, Pellati et al., 2018).

2.1.2. Mercado de *Cannabis* a nivel mundial y regional

El mercado mundial de cannabis se encuentra en un fuerte crecimiento, impulsado por un desarrollo en ámbitos de regulación, investigación, desarrollo de nuevos productos y fusiones de empresas vinculadas al sector. Dentro del cannabis medicinal, el subsector que tiene un mayor crecimiento es el de bajo THC, el cual encuentra menores resistencias y está regulado en unos 50 países del mundo (Uruguay XXI, 2021).

A nivel mundial hay varios países con distintos estatus legales, sin embargo Uruguay y Canadá son los únicos países en el mundo con un estatus completamente legal a nivel nacional que engloba el uso medicinal como recreativo. En Estados Unidos, 16 estados permiten el uso recreativo y 35 permiten el uso medicinal. En el continente Europeo se está avanzando pero existe una gran influencia regional (Uruguay XXI, 2021).

América Latina sigue avanzando en el mercado de cannabis, esto gracias a las ventajas competitivas que presenta a nivel regional y mejoras en las legislaciones que flexibilizan ciertos procesos, provocando un aumento de las inversiones extranjeras que buscan optimizar el nivel primario, con menores costos de producción y mejores condiciones ambientales para el desarrollo del cultivo, obteniendo un producto final de alta calidad. En el continente, Uruguay y Colombia son los pioneros en la producción primaria, aunque recientemente existe un desarrollo en países como México y Chile que se encuentran en proceso de regulación (Uruguay XXI, 2021).

2.1.3. Importancia del cultivo en Uruguay

En diciembre del año 2013 Uruguay promulgó la ley N° 19.172 (2014) la cual regula la producción de cannabis para uso recreativo, medicinal e industrial, siendo el primer país en el mundo en hacerlo (Uruguay XXI, 2021).

Para el año 2021 en el país existen 76 empresas que cultivan cannabis no psicoactivo, manejando una superficie de 456 hectáreas a cielo abierto y adicionalmente cuentan con 90.000 m² de cultivo cubierto. Los cultivos se distribuyen por todo el país, teniendo una mayor concentración en la zona sur y sur-este. Adicionalmente según datos del Instituto de Regulación y Control de Cannabis (IRCCA) hasta noviembre de 2021, existen 15 licencias otorgadas para producción de cannabis psicoactivo, de las cuales 10 son para uso medicinal y las restantes para uso recreativo; mientras que además hay 21 licencias otorgadas para la industrialización (IRCCA, 2021, Uruguay XXI, 2021).

En el año 2020, el sector empleo directamente a más de 1070 trabajadores, de los cuales el 80% eran del interior del país, y además un 35% eran mujeres. En etapas de la zafra como los trasplantes o la cosecha existe una mayor exigencia de mano de obra, estimándose unas 8 a 10 personas por hectárea para trasplante y de 18 a 22 personas para la cosecha. Estos datos no incluyen los empleos indirectos que genera el sector en materia de insumos y servicios de logística (Uruguay XXI, 2021).

De las exportaciones totales de productos derivados de cannabis (flores semillas y medicamentos), entre 2019 y 2021 las exportaciones de flores representaron el 97%, siendo 6765 kg entre flores de uso medicinal y recreativo en el año 2021, teniendo a Suiza como el principal destino en volumen. También hay registros de exportaciones de otros productos como semillas y medicamentos a países como EEUU y países de la región como Brasil, Argentina y Perú (Uruguay XXI, 2021).

2.2. PRINCIPALES ENFERMEDADES FÚNGICAS QUE AFECTAN EL CULTIVO DE *Cannabis sativa*

Las enfermedades presentes en el cultivo de *C. sativa* son causadas por patógenos como hongos, bacterias, virus y nematodos, como también por factores abióticos (deficiencias nutricionales, enfermedades genéticas). La prevalencia de enfermedades está determinada por el tipo de cultivo, además de las condiciones climáticas y geografía (McPartland, 1996).

Entre las enfermedades fúngicas que afectan el cultivo, existen 420 taxones patógenos de *C. sativa*; de los cuales según una revisión realizada por McPartland (1992) determinó que se trata de 88 especies, dado que el resto se trataba de especies no patógenas o sinónimos, por ejemplo, el Moho gris causado por *Botrytis cinerea* tenía 7 nombres diferentes para referirse a la enfermedad.

A continuación se presentan diez de las principales enfermedades fúngicas que afectan el cultivo de *C. sativa*, ordenadas de acuerdo a su incidencia e importancia (McPartland et al., 2000, Fassio et al., 2013).

2.2.1. Moho gris

El moho gris, causado por *Botrytis cinerea* es una enfermedad muy común en una gran variedad de especies; se trata de un hongo dentro del filo *Deuteromycotina*, clase *Hyphomycetes*, comprendido dentro del orden de los *Hyphales (Moniliales)* (Agrios, 2007).

En cannabis ataca a nivel de los racimos florales y tallo. Los síntomas en flor comienzan con un amarillamiento y posterior marchitamiento de las estructuras florales, la cual en condiciones de alta humedad quedan envueltas en una pelusa gris. Los ataques a nivel de tallo comienzan con una coloración clorótica del área infectada, la cual con el avance de la enfermedad pasan a formar canchales que pueden rodear el tallo y provocar el marchitamiento de los tejidos ubicados por encima. En condiciones de alta humedad los canchales quedan cubiertos de conidios, existiendo la posibilidad que se formen esclerocios pequeños de color negro dentro de los tallos (McPartland et al., 2000).

El desarrollo de la enfermedad se ve favorecida con condiciones de clima húmedo y fresco, con temperaturas entre 15-18 °C, y alta humedad relativa ambiente, en el entorno de 80% o mayor (Giménez et al., 2003).

2.2.2. Cancro del cáñamo

La enfermedad cancro del cáñamo es causada por el patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, género perteneciente al filo *Ascomycotina*, clase *Leotiomycetes*, orden *Helotiales* (McPartland et al., 2000).

Según McPartland et al. (2000) los ataques en cannabis se dan al final del verano en plantas en activo crecimiento, en la zona baja cercana al suelo o en los dos tercios superiores. Las lesiones aparecen en tallos y ramas, posteriormente los tejidos debajo de las lesiones colapsan, generando canchales de color marrón claro, las cuales en condiciones de humedad se envuelven de un micelio de color blanco. A finales de verano aparecen esclerotos sobre los canchales, y se forman grandes esclerotos dentro del tallo de la planta afectada, la cual puede permanecer en esas condiciones o marchitarse y caer.

Condiciones de alta humedad en el suelo entre 7-14 días, alta humedad relativa ambiente durante varios días y temperaturas frescas alrededor de 17°C son las ideales para el desarrollo de la enfermedad (Navia et al., 2020).

2.2.3. Damping off

Esta enfermedad puede ser provocada por varios géneros de hongos, por ejemplo *Pythium*, *Botrytis*, *Macrophomina*, *Rhizoctonia* entre otros. Los ataques se dan a nivel de almácigo y puede ser antes que emerja del suelo, posterior a la emergencia, y en una etapa más avanzada en la cual la planta tiene hasta 8 hojas verdaderas. Cuando el ataque se da posterior a la emergencia, el síntoma principal es una pudrición a nivel del suelo que posteriormente causa el marchitamiento y volcado de la plántula. Cuando se da en una etapa más avanzada, los síntomas comienzan con un retraso en el crecimiento y las hojas se tornan de un color amarillo pálido, posteriormente se marchita la planta y muere (McPartland et al., 2000).

Las condiciones que favorecen el desarrollo de la enfermedad son una alta humedad del suelo y alta humedad ambiente, en conjunto con condiciones de temperatura las cuales son más o menos favorables según el género que cause la enfermedad, por ejemplo el género *Pythium* se ve favorecido con temperaturas frescas (Lasa y Smith, 1981).

2.2.4. Mancha amarilla de la hoja

La mancha amarilla de la hoja, también conocida como septoriosis es causada por hongos del género *Septoria*, género que se encuentra dentro del filo *Deuteromycotina*, clase *Coelomycetes*, orden *Sphaeropsidales*. Afectan una diversidad de especies en todo el mundo, desde cereales, hortalizas y plantas ornamentales generando tizones y manchas foliares; además de estos síntomas puede causar ahogamiento de plántulas dada la capacidad de infectar semillas (Agrios, 2007).

En *Cannabis* se han registrado daños causados por las especies *Septoria cannabis* y *Septoria neocannabina*. Los síntomas comienzan con pequeñas lesiones en hojas inferiores, las cuales posteriormente se agrandan a formas irregulares, quedando delimitados los bordes por las nervaduras. Las lesiones son de colores blanquecinos hasta grisáceos, y en su interior se pueden observar puntos negros correspondientes a los picnidios en el haz de la hoja, siendo los responsables de comenzar infecciones

secundarias; con el tiempo las lesiones se secan y se rajan las hojas. Se han registrado ataques severos en el cual las hojas inferiores se arrugan, marchitan y se caen de forma prematura, aunque también puede darse en hojas superiores (McPartland et al., 2000).

Las condiciones ambientales predisponentes para el desarrollo del patógeno son una temperatura entre 10-27 °C, condiciones de alta humedad y salpicado de gotas de lluvia o riego que benefician la dispersión de los conidios que son liberados por los picnidios (Agrios, 2007).

2.2.5. Podredumbre de raíz y tallo

El patógeno causante de esta enfermedad es *Rhizoctonia solani*, género perteneciente al filo *Basidiomycotina*, clase *Agaricomycotina*, perteneciente al orden de los *Ceratobasidiales*, familia *Ceratobacidiaceae* (DGSV, 2020b).

El género *Rhizoctonia* genera pérdidas en especies de todo el mundo, plantas anuales, malezas, hortalizas, especies ornamentales, incluso árboles y arbustos. Los síntomas más comunes son la pudrición de raíz, pudrición y cancro de tallo, ahogamiento de plántulas (Agrios, 2007).

Los síntomas en *Cannabis* comienzan con la coloración de las raíces, y clorosis de las hojas que posteriormente se marchitan. Por lo general no son detectadas las manchas radiculares, que con el paso del tiempo avanzan con una coloración marrón oscuro hacia la base del tallo y varios centímetros por encima causando una pudrición y destrucción de los tejidos. Cuando los ataques se dan en plantas de menos de tres meses se vuelcan y mueren en un par de semanas, sin embargo en plantas de más de tres meses pueden llegar a sobrevivir. A veces en la zona afectada del tallo pueden aparecer pequeños esclerocios de color negro (McPartland et al., 2000).

El patógeno inverna en forma de micelio o esclerocios en el suelo, en especies perennes infectadas o en órganos de propagación; se disemina por el agua de riego o con órganos de propagación. La temperatura óptima para infectar se encuentra entre 15-18 °C, teniendo un impacto más severo cuando el cultivo se desarrolla en suelos de textura pesada (Agrios, 2007).

2.2.6. Mancha marrón de la hoja y cancro del tallo

La enfermedad es causada por varias especies de hongos de los géneros *Phoma* y *Asochyta*, géneros que pertenecen al filo *Deuteromycotina*, clase *Coelomycetes*, orden *Sphaeropsidales*. Entre las especies que causan la enfermedad se ha registrado a *P. cannabis*, *A. arcuata*, *P. exigua*, *P. glomerata*, *P. herbarum*, *P. piskorzii*, *A. prasadi*, *A. cannabina*, *P. nebulosa* (Fassio et al., 2013).

Los síntomas de la enfermedad comienzan en las hojas inferiores, presentándose como manchas circulares o de bordes rectos acompañando a las nervaduras, con un diámetro de aproximadamente 5 mm pero que puede llegar a 15 mm. En el interior de las

manchas pueden aparecer picnidios de color negro o pseudotecios dependiendo de la especie que este causando la enfermedad. Posteriormente por lo general las manchas más viejas se desprenden dejando un cribado en la hoja. Los síntomas a nivel de tallo comienzan como manchas cloróticas que posteriormente toman colores grisáceos o marrones y adquieren una forma alargada; sobre las manchas se desarrollan los pseudotecios del patógeno. Las plantas afectadas se atrofian, logrando una menor altura que las plantas sanas, llegando a ser de aproximadamente 30 cm (McPartland et al., 2000).

2.2.7. Mildiu

El género *Pseudoperonospora* pertenece a la clase de los *Oomycetes*, orden *Peronosporales*, familia *Peronosporaceae*; a diferencia de los hongos superiores estos pertenecen al reino *Chromista* (Agrios, 2007).

El Mildiu se da desde plantas medianamente desarrolladas a plantas maduras presentándose como manchas amarillas en hoja con forma angular y de tamaño irregular limitadas por las nervaduras. En el interior de las manchas en el envés de hoja el micelio emerge por los estomas para esporular. Las lesiones causadas en hoja rápidamente se expanden provocando que las hojas se contraigan, necrosen y caigan. Han sido registradas dos especies como agentes causales de la enfermedad, *P. cannabina* y *P. humuli* (McPartland et al., 2000).

El patógeno inverna en restos en el suelo como oosporas, las cuales en condiciones de humedad germinan y se diseminan por el viento o salpicado de gotas de lluvia. Cuando sus esporangios o zoosporas llegan a hojas húmedas cercanas al suelo se da la penetración e infección a través de los estomas del envés de las hojas (Agrios, 2007).

2.2.8. Cancro del tallo por *Fusarium*

Fusarium, género perteneciente al filo *Ascomycotina*, clase *Sordariomycetes*, orden *Hypocreales*, familia *Nectriaceae*. Patógenos habitantes de suelo que sobreviven en restos de cultivos infectados (DGSV, 2020a).

Muchas especies del género *Fusarium* son patógenas de *C. sativa* y son causantes de varias enfermedades. En el caso de cancro de tallo han sido reportadas seis especies asociadas a la enfermedad como lo son *F. sulphureum*, *F. graminearum*, *F. lateritium*, *F. sambucinum*, *F. avenaceum* y *F. culmorum* (McPartland et al., 2000, Fassio et al., 2013)

Los ataques suelen darse desde mitad de zafra en adelante, comenzando con lesiones húmedas en la epidermis del tallo, seguida por una clorosis y posteriormente necrosis de los tejidos afectados. Los tallos suelen inflamarse en la zona afectada, formándose cancos fusiformes que luego se rajan; las hojas asociadas a los tallos afectados se necrosan sin desprenderse de la planta. Cuando se hace un corte de tallo en un cancro abierto suele observarse una coloración rojo amarronada (McPartland et al., 2000).

2.2.9. Podredumbre radicular o del pie

El agente causal de esta enfermedad es *Fusarium solani*, el cual está distribuido por todo el mundo y puede provocar cancro del tallo en lugar de podredumbre a nivel de la raíz (McPartland et al., 2000).

El ataque comienza a nivel de las raíces, donde por lo general el patógeno ingresa a partir de lesiones causadas por otros organismos, provocando que las raíces tomen una coloración rojiza que posteriormente se ponen necróticas y se pudren. La pudrición se extiende hacia arriba y es ahí cuando se pueden ver los síntomas a campo a nivel de la base del tallo, provocando que la planta se marchite de forma total o parcial. Esta enfermedad derriba plantas en todos los estadios de desarrollo, incluso plántulas (Zelenay, Barloy y Pelhate, citados por McPartland et al., 2000).

La enfermedad se ve favorecida con condiciones de suelo húmedo, y temperaturas de suelo frías de alrededor de 20°C (DGSV, 2020a).

2.2.10. Marchitamiento por *Fusarium*

Esta enfermedad es provocada por el patógeno *Fusarium oxysporum*; los síntomas comienzan en las hojas basales como pequeñas manchas oscuras de forma irregular que luego se vuelven cloróticas. Los síntomas de marchitamiento comienzan con el enrollamiento hacia arriba de las puntas de las hojas, que posteriormente se secan y cuelgan de la planta. El tallo también toma un color amarillo bronceado, y si se corta en el interior se puede observar una coloración rojiza amarronada. Las plantas muertas pueden quedar parcialmente envueltas en un micelio blanquecino rosado, mientras que las plantas sobrevivientes quedan atrofiadas (McPartland et al., 2000).

Hartman et al. (1999) reportaron que el marchitamiento por *F. oxysporum* en el cultivo de soja se ve favorecido con suelos saturados y temperatura ambiente entre 14-23 °C, también con situaciones de estrés que reducen el crecimiento y desarrollo de plantas.

2.3. TIZÓN EN CANNABIS

Dentro de los principales patógenos que pueden causar tizón en *C. sativa* hay tres causadas por hongos y dos causadas por bacterias. Los tizones causados por hongos son: el tizón de la ramita (*Dendrophoma marconii*, *Botryosphaeria marconii*), tizón marrón o alternariosis (*Alternaria spp.*) y tizón sureño (*Sclerotium rolfsii*). Dentro de los tizones causados por bacterias, los principales son: tizón bacteriano (*Pseudomonas syringae pv. cannabina*) y tizón por *Xanthomonas* (*Xanthomonas campestris pv. cannabis*) (McPartland et al., 2000).

2.4. CANCRO DE TALLOS Y RAMAS CAUSADO POR BOTRYOSPHAERiaceae

Esta enfermedad se reportó en Europa, Asia, América del Norte y América del Sur. Según Denwey, Barloy y Pelhate consideraron que la enfermedad no tiene importancia económica, sin embargo Charles y Jenkin informaron pérdidas de hasta 95% en Virginia (Denwey, Barloy y Pelate, Charles y Jenkins, citados por McPartland et al., 2000).

McPartland et al. (2000) describe como agente causal a *Botryosphaeria marconii* por Charles y Jenkins (1914).

Más recientemente otro agente causal perteneciente a la familia de las *Botryosphaeriaceae* como lo es *N. parvum* ha sido reportado como patógeno en *C. sativa* (Alberti et al., 2018, Feng et al., 2020).

En Uruguay entre los años 2018 y 2019 (Rousserie y Collazo)² en cultivos de *C. sativa* de los departamentos de Canelones y Montevideo, relevaron la enfermedad en dos cultivos bajo invernadero y en un cultivo a campo destinado a la producción de inflorescencias. En el cultivo a campo se encontró en las tres visitas realizadas, mientras que en los cultivos bajo invernadero fue observada en dos de diez visitas realizadas. En el 13,5% de las muestras provenientes de cultivos a campo se identificaron hongos de la familia *Botryosphaeriaceae*. En cuanto a momento del año y el estado fenológico del cultivo se observó la enfermedad en el cultivo a campo en los meses de enero, febrero y marzo en plantas que se encontraban en el último mes de desarrollo vegetativo o en floración.

2.4.1. Descripción taxonómica y morfológica

La familia *Botryosphaeriaceae* pertenece al filo *Ascomycota*, se encuentra dentro de la clase de los *Dothideomycetes*, orden *Botryosphaeriales* (Hawksworth, citado por Romero, 2012). Hoy en día se conocen 17 géneros dentro de la familia, los cuales pueden ser reconocidos filogenéticamente: *Diplodia*, *Neodeighonia*, *Lasiodiplodia*, *Sphaeropsis*, *Phaeobotryon*, *Barriopsis*, *Botryobambusa*, *Tiarosporella*, *Botryosphaeria*, *Macrophomina*, *Cophinforma*, *Neoscytalidium*, *Dothiorella*, *Spencermartinsia*, *Neofusicoccum*, *Endomelanconiopsis*, *Pseudofusicoccum* (Phillips et al., 2013).

Las características utilizadas para diferenciar los géneros, han sido la morfología de las ascosporas y estado de los conidios, sobre todo rasgos conidiales como la pigmentación, grosor de la pared y la tabicación; sin embargo estas características se pueden llegar a interpretar de forma significativa con datos adicionales como la identificación molecular (Phillips et al., 2013).

² Rousserie, G.; Collazo, D. 2018. Prospección de enfermedades y plagas asociadas a los cultivos de Cannabis (sin publicar).

Las ascosporas pueden ser de forma fusiforme a ovoide, siendo más ancha en la zona media y angostándose hacia los extremos que son poco redondeados. Las mismas pueden ser hialinas o coloreadas, aseptadas o con uno o dos tabiques. En especies que poseen ascosporas hialinas y aseptadas, con el pasar del tiempo pueden tomar una coloración amarillada traslúcida y septarse, con uno a dos tabiques (Phillips et al., 2013).

Los conidios presentan una gran variabilidad morfológica entre géneros, como también existe variabilidad dentro de la misma especie. Básicamente se pueden distinguir dos tipos de conidios, los de paredes delgadas y estrechos, similares al género *Fusicoccum*, y los de paredes más gruesas y anchos, similares al género *Diplodia*. Además de estos tipos básicos existen otros tipos con características que los asocian con algunas especies de otros géneros (Phillips et al., 2013).

Según Phillips et al. (2013), en algunas especies hay superposición de caracteres, como también algunos caracteres no son estables entre poblaciones o individuos de una determinada especie, por ejemplo, se ha observado que no en todos los aislados de *N. luteum* y *N. australe* producen un pigmento amarillo en medio de cultivo y recientemente se encontró la misma producción de pigmentos en aislamientos de *N. parvum*.

Actualmente se conocen 22 especies de *Neofusicoccum*, las cuales han sido diferenciadas en base a dimensiones conidiales, pigmentación, producción de pigmentos en medio de cultivo y datos de secuencia ITS; recientemente se ha cuestionado la importancia taxonómica de estos caracteres (Phillips et al., 2013, Abdollahzadeh et al., 2013).

Para la identificación certera de especies es necesario el uso de datos de secuencias para la región ITS, o en combinación con datos de secuencia EF1- α (Phillips et al., 2013).

El género *Neofusicoccum* fue introducido por Crous et al. (2006) para especies que son morfológicamente similares, pero filogenéticamente distintas a *Botryosphaeria*, por ende *N. parvum* se encuentra dentro de un grupo de especies de características morfológicas muy similares que pueden distinguirse solo sobre base de datos de secuencias de ITS y EF1- α .

Neofusicoccum parvum ha sido diferenciado por varios investigadores por la coloración marrón pálido de las células centrales y tabicación de los conidios al momento de la germinación, pero Abdollahzadeh et al. (2013) en un estudio con 34 aislamientos observo que en todos ellos, los conidios viejos permanecieron hialinos incluso luego de 10 semanas. También informó la producción de un pigmento amarillo en algunos aislados de *N. parvum* de una población iraní, la cual es una característica nunca antes vista.

2.4.2. Síntomas en cannabis

Según McPartland et al. (2000) la enfermedad comienza con el marchitamiento y caída de hojas al final de temporada. Las hojas se marchitan adquiriendo una coloración

marrón y mueren, pero quedan adheridas a la planta. Las puntas de las ramas jóvenes muestran primero los síntomas, y en dos semanas puede marchitarse toda la planta y morir.

Los tallos enfermos desarrollan manchas grises con tamaños de 6 a 12 mm de largo y entre 2 y 6 mm de ancho (Flachs, citados por McPartland et al., 2000). Estas manchas toman colores más oscuros y presentan picnidios y/o pseudotecios. Las manchas se siguen agrandando incluso luego de la cosecha de las plantas (Gitman y Malikova, citados por McPartland et al., 2000).

Según Alberti et al. (2018) detalla que la enfermedad causada por *N. parvum* afecta el cultivo de *C. sativa* próximo a la cosecha. Las plantas presentan canchales en tallo con picnidios en su interior y muerte de ramas. Según Feng et al. (2020) las plantas afectadas por *N. parvum* a campo presentan clorosis en hoja y enrollamiento de las mismas, también observó muerte de ramas y de plantas con ramas afectadas.

2.4.3. Ciclo de la enfermedad

Al tratarse de un patógeno con actividad saprofítica, tiene la capacidad de sobrevivir en plantas infectadas y sobre residuos infectados en estructuras como lo son los picnidios, los cuales en condiciones de alta humedad y lluvias prolongadas liberan cirros de conidios que son dispersados con el salpicado de las gotas de lluvia, comenzando nuevas infecciones, penetrando por heridas en plantas (Van Niekerk et al., 2010).

McPartland y Hilling (2007) señalan que es en la primavera cuando se da la producción y diseminación de conidios en plantas de cannabis infectadas.

Según Romero (2012) el establecimiento de las infecciones causadas por la familia *Botryosphaeriaceae* está condicionado por el estado del huésped, favoreciéndose en condiciones de estrés ya sea ambiental, nutricional o hídrico.

2.4.4. Manejo de la enfermedad

McPartland et al. (2000) señala, que para el manejo de la enfermedad básicamente se encuentran disponibles una serie de prácticas culturales y mecánicas, las cuales se basan en disminuir la fuente de inóculo y evitar condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad.

El saneamiento es uno de los métodos recomendados para el manejo de la enfermedad, el cual consiste en retirar restos de cultivo que pueden ser fuente de inóculo para el cultivo siguiente (McPartland et al., 2000).

Evitar el riego por aspersión y manejar una densidad de siembra adecuada para favorecer la aireación del cultivo y evitar los excesos de humedad que favorecen el desarrollo de esta enfermedad y otras (McPartland et al., 2000).

Mantener plantas vigorosas, evitando estrés por déficit hídrico, debido a que las pérdidas se multiplican. McPartland y Schoeneweiss (1984) demostraron cómo las especies de *Botryosphaeria* selectivamente atacan plantas estresadas.

La resistencia genética puede ser otro método a utilizar, Dempsey, citado por McPartland et al. (2000) enumeró variedades de cáñamo rusas y ucranianas con resistencia a *B. marconii*. Estas variedades han ido desapareciendo pero se han utilizado de padres de algunos cultivares actuales.

Las variedades utilizadas en Uruguay, como por ejemplo “CW2A”, variedad de cáñamo utilizada para fabricación de diversos productos de uso tópico, y cosméticos, es resistente a la mayoría de los virus y enfermedades comunes a los cultivos de cereales y hortalizas, ligeramente susceptible a *Oidium sp.* y *Botrytis cinerea*, ligeramente menos susceptible a *Phytophthora spp.*, *Fusarium spp.*, y *Pythium spp.* Sin embargo no presenta resistencia ni tolerancia a enfermedades causadas por hongos de la familia de las *Botryosphaeriaceae* (Stanley, 2019).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo entre noviembre 2021 y marzo del 2022 en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo.

Se utilizaron tres aislados de *N. parvum* de la colección del Laboratorio de Fitopatología provenientes de plantas de *C. sativa* de los departamentos de Canelones y Montevideo de los años 2018 y 2019 que son conservados a -20°C en papel filtro dentro de sobres esterilizados.

Cuadro No. 1. Origen de los aislados utilizados.

Aislado	Órgano	Variedad	Cultivo	Departamento	Año
Cluc F	Tallo	Galaxy	Campo	Montevideo	2018
Migues 1	Tallo	CW2A	Campo	Canelones	2019
Migues 14	Tallo	CW2A	Campo	Canelones	2019

3.1. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

Para la recuperación del hongo se procedió sembrando trozos de papel filtro de los aislados conservados en placas de Petri con medio papa dextrosa agar (PDA), luego se incubaron a 25°C y en oscuridad durante cinco días. Luego de observar crecimiento y recuperar los aislados se procedió a repicar a medio PDA nuevamente, incubando en cámara oscura a 25°C por cinco días. Posteriormente los tres aislados recuperados fueron repicados y sembrados en dos medios de cultivos, con diferentes finalidades: medio PDA y agar agua (AA) con agregado de acículas de pino estériles. En medio PDA se incubaron a una temperatura de 25°C en oscuridad, con la finalidad de observar las características de las colonias con el avance de los días, a los 3, 8 y 16 días. En medio AA con agregado de acículas de pino estériles se incubaron a 25°C con 12 horas de luz ultravioleta cercana e iluminación fluorescente, por un período de 2 a 10 semanas, con la finalidad de observar las características morfológicas de las estructuras reproductivas.

Para la descripción se utilizó lo descripto por Phillips et al. (2013).

3.1.1. Características de las colonias

Todos los aislados fueron sembrados en medio PDA e incubados a 25°C en oscuridad, observando en el anverso y reverso de la placa las características morfológicas

de las colonias, color, forma, producción o no de pigmentos a los 3, 8 y 16 días de incubación.

3.1.2. Características de los conidios

Los aislados se sembraron en medio AA con la incorporación de acículas de pino estériles en superficie, se incubaron a una temperatura de 25°C con 12 horas de fotoperiodo con luz ultravioleta cercana y luz fluorescente, por un periodo mínimo de dos semanas. Luego del desarrollo de las estructuras reproductivas se procede a medir el largo y ancho de 30 conidios por cada aislado, utilizando microscopio óptico Olympus CX23 con 400x de aumento, utilizando una cámara digital (Dino-Eye AM-4023X, Taiwan) con el programa (DinoCapture 2.0).

3.2. PRUEBA DE PATOGENICIDAD

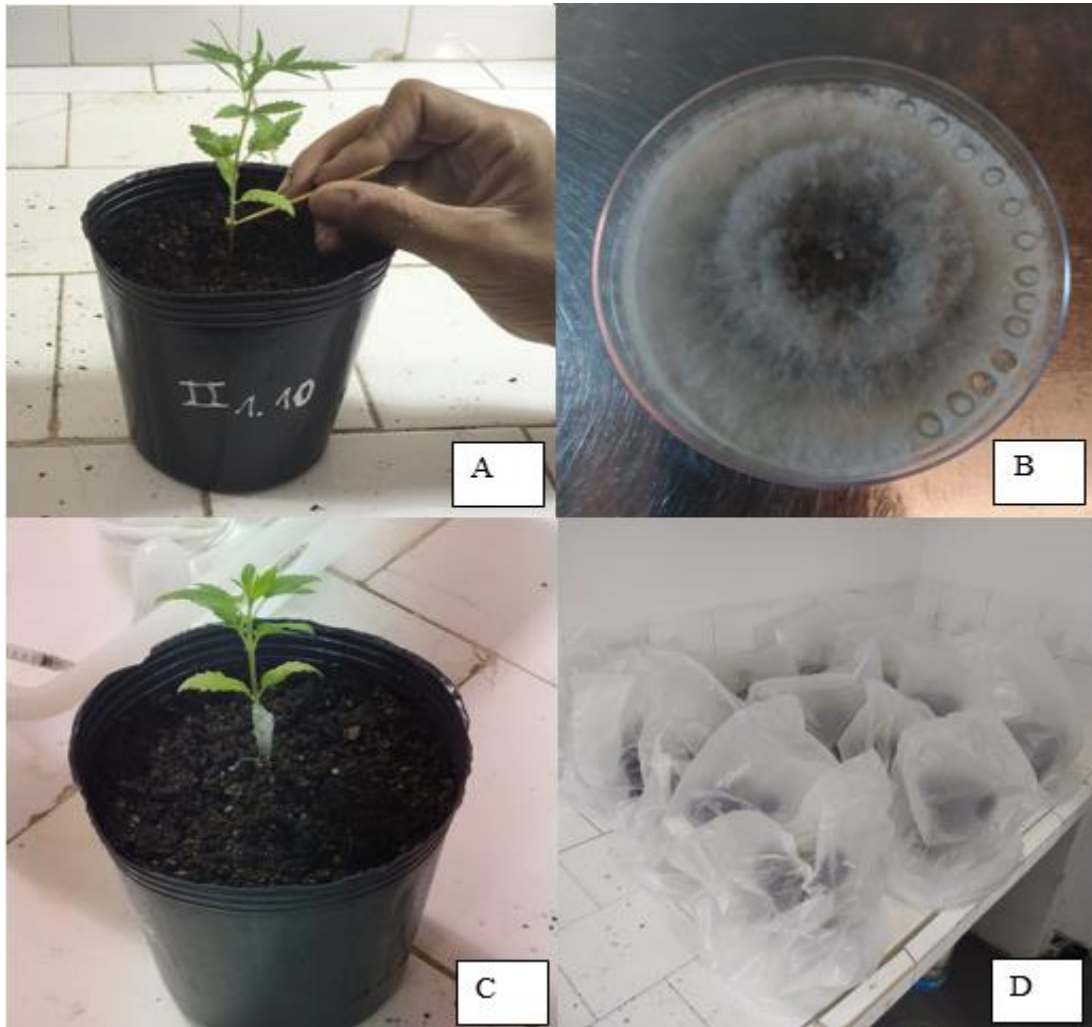
Se utilizaron 57 platines de *C. sativa* de la variedad Fenochis con 30 días de edad, los cuales fueron trasplantados a macetas N° 12 de 0,8 litros aproximadamente con sustrato GROWMIX MULTIPRO compuesto por turba de musgo Sphagnum de fibra fina, compost de corteza fina, perlitas, calcita, dolomita y agentes humectantes. Las plantas se mantuvieron a 25°C y con un fotoperiodo de 16 horas en el Solárium del laboratorio de Fitopatología.

Las plantas se inocularon con los aislados de *N. parvum* siguiendo el método utilizado por Feng et al. (2020), que consistió en realizar una pequeña herida a la altura de los cotiledones con escarbadiantes estériles. Posteriormente se procedió a colocar sobre la herida un disco de micelio de cinco milímetros de diámetro, que fue extraído con sacabocado de una colonia de cuatro días de edad en medio PDA; dicho proceso se realizó para los aislados Cluc F, Miguez 1, Miguez 14, como también se inocularon plantas con discos de medio PDA estériles correspondientes al tratamiento control; todos los discos fueron fijados a la herida con parafilm.

El diseño experimental consistió en bloques completamente al azar con cuatro tratamientos (aislados Cluc F, Miguez 1, Miguez 14 de *N. parvum* y el testigo) y tres repeticiones. La unidad experimental fue de cinco plantas por parcela en los tres aislados y en el testigo fue de cinco plantas en los bloques uno, cinco para el bloque dos y dos plantas en el bloque tres.

Se realizó análisis de varianza (ANOVA) y las medias de los tratamientos se compararon por Tukey (5%) (Genes 2013.5.1)

Por cada uno de los tres aislados se inocularon 15 plantas, mientras que para el tratamiento testigo se utilizaron 12. Las plantas inoculadas fueron sometidas a cámara húmeda por 48 horas, utilizando bolsas de nylon transparente individuales, las cuales fueron rociadas previamente con agua destilada en su interior. Las condiciones de temperatura y fotoperiodo se mantuvieron fijas.



A) Herida realizada; B) Placa con discos de micelio de *Neofusicoccum parvum*; C) Planta inoculada; D) Cámara húmeda con bolsas de nylon transparente.

Figura No. 2. Inoculación de *N. parvum*. en planta de cáñamo de la variedad Fenochis.

3.3. RE-AISLAMIENTO

El re-aislamiento del patógeno se realizó a partir de los picnidios producidos sobre las lesiones en tallo de las plantas inoculadas. Se utilizaron tres plantas por tratamiento (una planta por bloque) con síntomas y signo, con las cuales en una cámara de flujo laminar desinfectada con alcohol 70°, con la ayuda de un mechero y aguja esterilizada se extrajeron picnidios que fueron sembrados en una placa de Petri por planta en medio PDA. Posterior a la siembra se incubaron en cámara oscura a 25°C.

Luego de tres días de incubación, se observaron las colonias con el mismo criterio utilizado para la identificación cultural (color, forma, producción de pigmentos), observando a los 3, 8 y 16 días post-siembra para confirmar la presencia del patógeno.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

En la observación de las placas de los aislados Cluc F, Migues 1 y Migues 14 (Figura No. 3, 4 y 5 respectivamente) a los tres días de incubación se pudo observar un micelio aéreo blanquecino de textura algodonosa, con producción de pigmento amarillo muy tenue desde el centro observable con mayor claridad en el reverso que en el anverso de la placa. A los ocho días de incubación las colonias presentaron un denso micelio aéreo con colores blanco-grisáceos a gris observable en el anverso y verde oliva en reverso de la placa. En la última observación de las placas a los 16 días las colonias presentaban un micelio compacto de colores oscuros, que iban de coloraciones grises a negro en el anverso y verde oliva a negro en el reverso, coincidiendo con las características mencionadas por Pennycook y Samuels (1985) y Phillips et al. (2013).

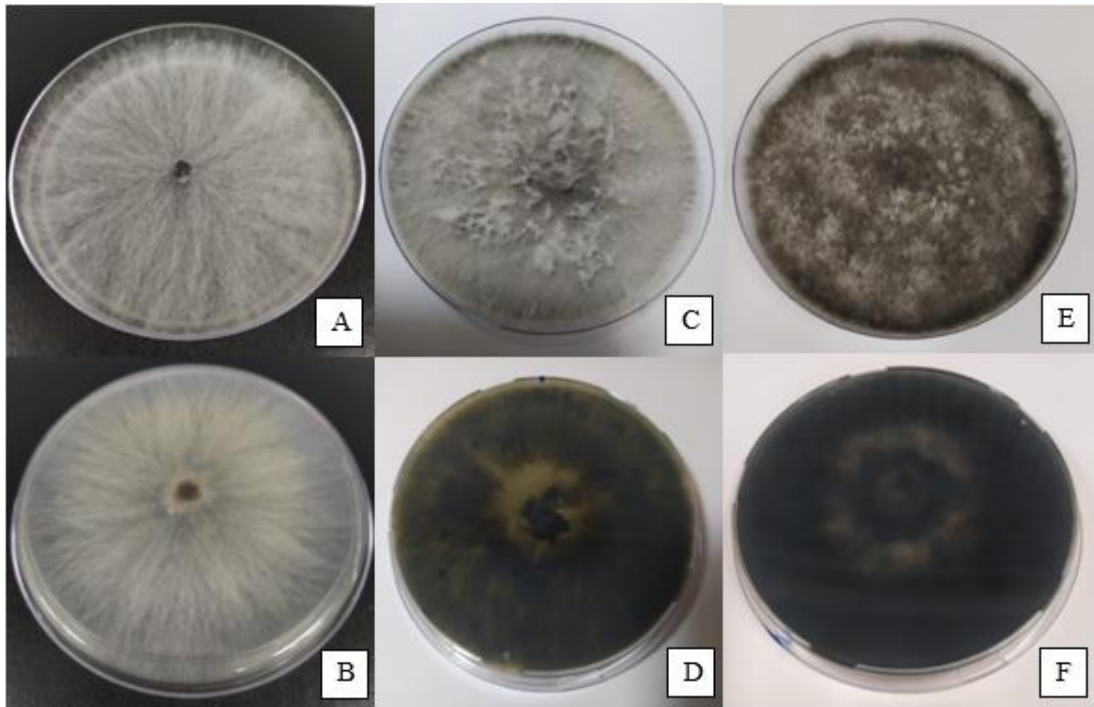


Figura No. 3. Colonia del aislado Cluc F de *N. parvum*. en anverso y reverso de la placa en medio PDA después de tres (A-B), ocho (C-D) y 16 (E-F) días de incubación.

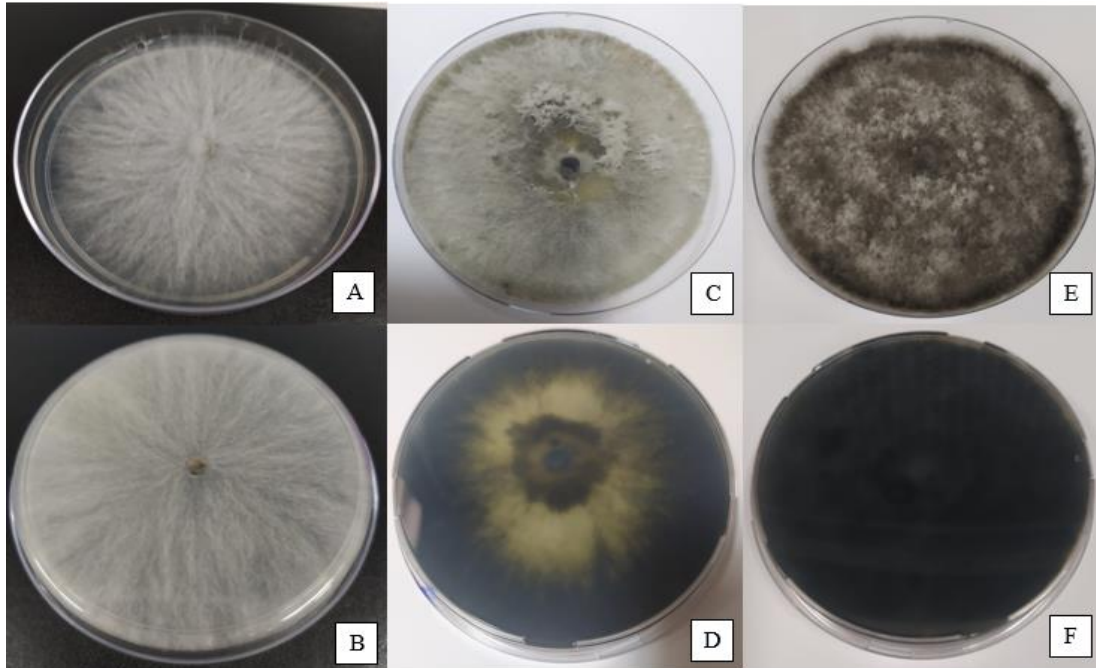


Figura No. 4. Colonia del aislado Migues 1 de *N. parvum*. en anverso y reverso de la placa en medio PDA después de tres (A-B), ocho (C-D) y 16 (E-F) días de incubación.

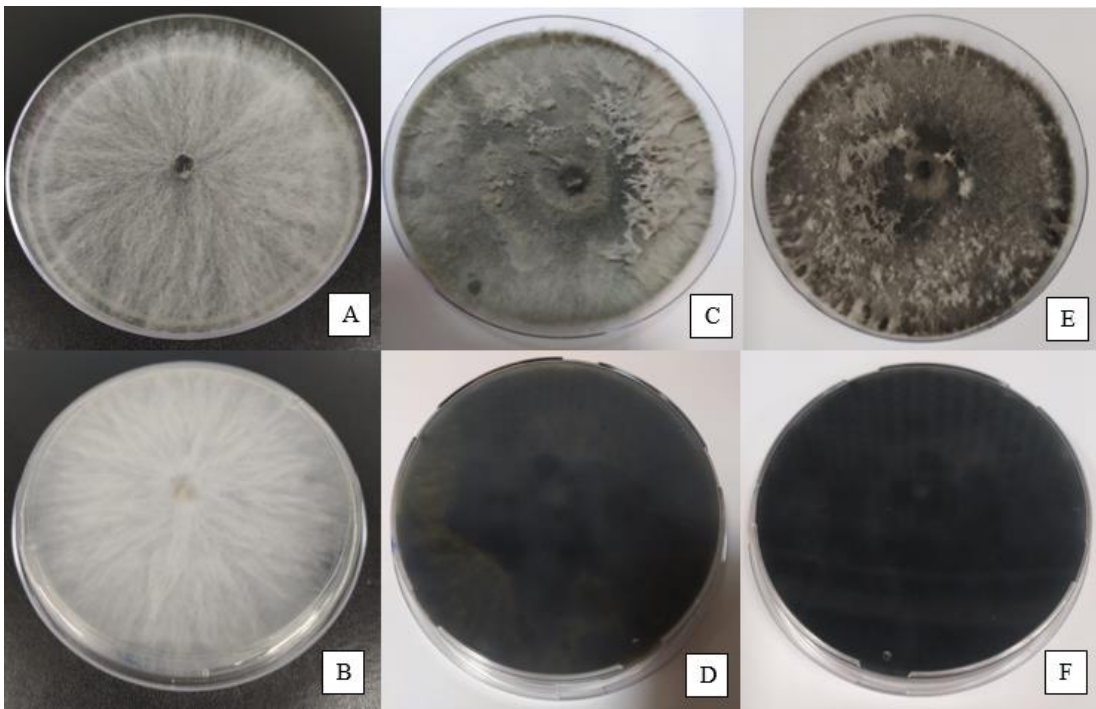


Figura No. 5. Colonia del aislado Migues 14 de *N. parvum*. en anverso y reverso de la placa en medio PDA después de tres (A-B), ocho (C-D) y 16 (E-F) días de incubación.

Luego de 49 días de incubación en medio AA con acículas de pino estériles, en los picnidios formados sobre las acículas en los tres aislados (Cluc F, Migues 1, Migues 14) se observó en el microscopio la presencia de abundantes conidios hialinos, de bordes lisos y de forma fusiforme, coincidiendo con la descripción de Pennycook y Samuels (1985) y de Phillips et al. (2013).

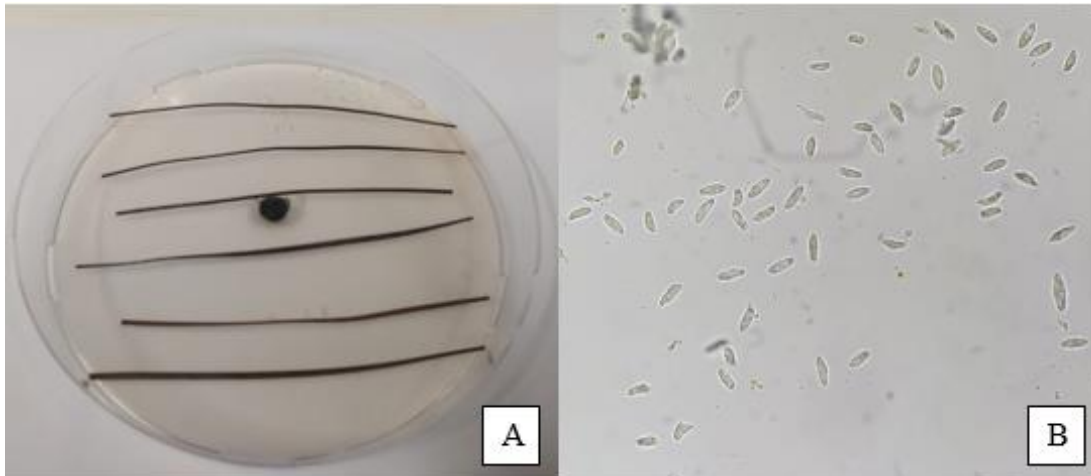


Figura No. 6. Cultivo de aislado Cluc F en medio AA con acículas de pino (A) y conidios observados en microscopio óptico con aumento 40X (B).

Se realizó la medición del largo y ancho de 30 conidios por aislado, obteniéndose los resultados de valores promedios, máximos y mínimos.

Para los tres aislados los resultados de largo promedio obtenidos fueron muy similares a los presentados por Phillips et al. (2013) para *Neofusicoccum parvum*, sin embargo los resultados obtenidos de ancho promedio fueron mayores a los presentados por el autor: 17,1 x 5,5 μm (cuadro No. 2). La totalidad de los valores se pueden ver en anexos 1,2 y 3.

Cuadro No. 2. Largo y ancho de conidios de los tres aislados de *N. parvum*.

Aislados	Tamaño conidial (μm)	Tamaño conidial promedio (μm)
Cluc F	14,105-19,706 x 7,108-9,698	16,676 x 8,365
Migues 1	14,43-19,837 x 7,117-9,554	17,127 x 8,448
Migues 14	14,442-19,710 x 7,280-9,896	17,260 x 8,395

4.2. PRUEBA DE PATOGENICIDAD

De las 45 plantas inoculadas con los aislados de *N. parvum*, 33 (73,3%) de las plantas exhibieron síntomas y signo (picnidios en tallo) de la enfermedad entre los 7-14 días post inoculación.

La razón por la cual algunas plantas no exhibieron síntomas ni signo y siguieron con su desarrollo normal se puede atribuir a fallas en la inoculación, probablemente porque el disco de micelio se deshidrato antes de infectar, no quedó en contacto de forma efectiva con la herida, o la herida provocada no fue adecuada en esos pocos casos.

La incidencia del tizón de tallo en plantas inoculadas con *N. parvum* fue similar para cada uno de los aislados, no teniendo diferencias significativas según el test de Tukey ($p=0,05$). Sin embargo Mígues 1 no se diferenció del testigo por fallas en la inoculación (Cuadro No.3).

Cuadro No. 3. Incidencia del tizón de en tallo en plantas de cannabis inoculadas con aislados de *N. parvum*.

Aislados de <i>N. parvum</i>.	Incendencia (%)
Mígues 14	86,67 A
Cluc F	73,33 A
Mígues 1	60,00 AB
Testigo	0,00 B

*Las medidas de los tratamientos seguidas de la misma letra no difieren significativamente por el test Tukey ($p=0,05$).

Al igual que lo descripto por McPartland et al. (2000) los síntomas observados en plantas comenzaron como un oscurecimiento de color marrón del tallo desde la zona de inoculación hacia arriba. A medida que avanzó la enfermedad provoco un marchitamiento generalizado de la planta y posterior necrosis, además se pudo observar con claridad la aparición de picnidios de color negro sobre las lesiones como lo describió Alberti et al. (2018) (Figura No. 8).

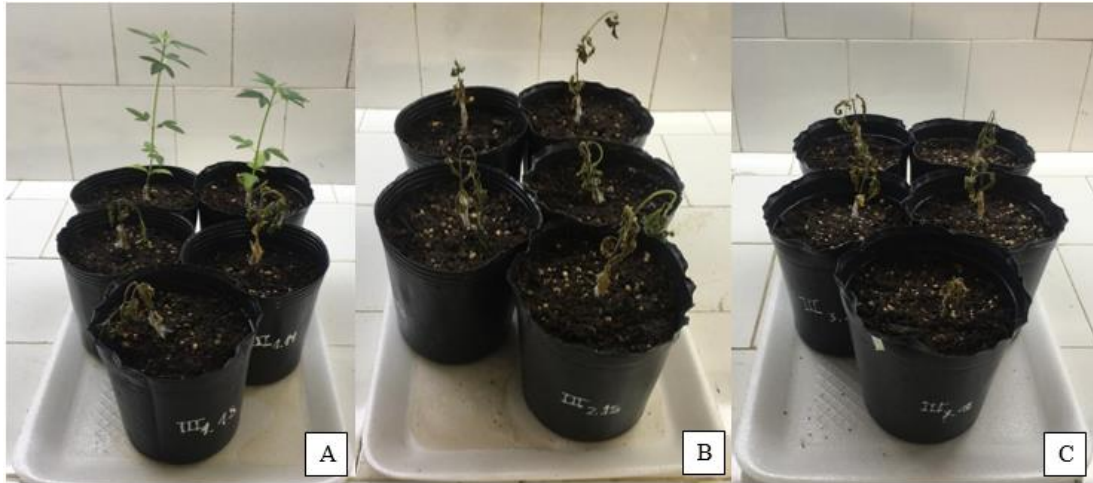
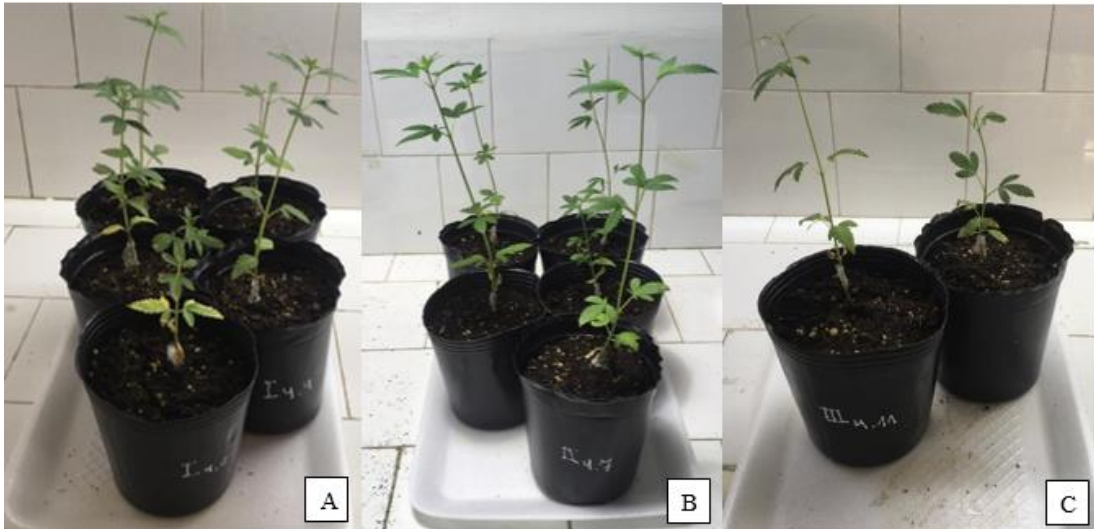


Figura No. 7. Necrosis en plantas del bloque tres inoculadas con aislados de *N. parvum*, Cluc F (A), Migues 1 (B) y Migues 14 (C) siete días post inoculación.



Figura No. 8. Picnidios en tallo por encima de la lesión en planta inoculada con *N. parvum*.

Las 12 plantas que formaron parte del tratamiento testigo no presentaron ningún tipo de sintomatología y continuaron con su desarrollo de forma normal (Figura No. 9).



A) Plantas sanas del tratamiento testigo bloque I; B) Plantas sanas tratamiento testigo bloque II; C) Plantas sanas tratamiento testigo bloque III.

Figura No. 9. Tratamientos testigos de los diferentes bloques.

Se realizaron aislamientos de las plantas con síntomas a partir de los picnidios a nivel de tallo, seleccionando una planta por bloque y por tratamiento. Para identificar los re-aislados se utilizaron métodos morfológicos, observación de colonias y observación de conidios en microscopio. Las plantas testigos se mantuvieron sanas y no se aisló *N. parvum* del tejido vegetal.

Al observar en microscopio preparados con picnidios extraídos de plantas que fueron inoculadas con los diferentes aislados de *N. parvum* se pudo visualizar conidios hialinos y fusiformes a elipsoidales, coincidiendo con los que fueron observados y medidos a partir de los cultivos en medio AA con acículas de pino estériles en la etapa previa a la inoculación (Figura No. 10).

Para la observación de las colonias de los re-aislados se utilizó el criterio descrito anteriormente en la etapa previa a la inoculación. Las colonias desarrolladas presentaron las mismas características a los aislados inoculados en plantas en cuanto a color, textura del micelio y producción de pigmentos a los 3 días de incubación en medio PDA (Figura No. 11).



Figura No. 10. Conidios de aislados Cluc F (A), Migues 1 (B) y Migues 14 (C) extraídos de picnidios de planta inoculada observado en microscopio óptico con aumento 40X.



Figura No. 11. Colonias de aislado Cluc F (A), Migues 1 (B) y Migues 14 (C), anverso de placa en medio PDA después de tres días de incubación.

Se ha reportado a *N. parvum* como agente causal de muerte regresiva y cancro en varias especies vegetales como alcornoque (Linaldeddu et al., 2007), olivos (Lazzizzera et al., 2008), vid (Spagnolo et al., 2011, Galarneau et al., 2019), azalea (Bertetti et al., 2011), mango (Ismail et al., 2013), granada (Riccioni et al., 2017), cacao (Puig et al., 2019) y fresa (Oliveira et al., 2019). Se reportó por primera vez como agente causal del cancro de tallos y ramas en *C. sativa* en Italia (Alberti et al., 2018), posteriormente se reportó en Estados Unidos (Feng et al., 2020).

En base a los resultados de este trabajo se caracterizaron los aislados de *N. parvum* como agente causal del cancro de tallos y ramas en cultivos de *C. sativa* en Uruguay. A futuro se podrán caracterizar los aislados de la familia *Botryosphaeriaceae* de

la colección de hongos de cannabis de fitopatología, así como realizar estudios epidemiológicos y conocer la susceptibilidad de las variedades de cáñamo de manera de contribuir al conocimiento del cancro de tallos y ramas y su manejo en Uruguay.

5. CONCLUSIONES

Este trabajo es el primero en probar la patogenicidad de aislados de *Neofusicoccum parvum* en *Cannabis sativa* en Uruguay.

En base a los resultados obtenidos, se concluye: los tres aislados de *N. parvum* evaluados causan el cancro de tallos y ramas en plantas de cannabis en Uruguay.

6. RESUMEN

El cultivo de *Cannabis* es relativamente nuevo en Uruguay, teniendo un impulso y crecimiento a partir del año 2013 luego de la promulgación de la ley N° 19.172, siendo el primer país en el mundo en regular la producción de cannabis para uso recreativo, medicinal e industrial. Los cultivos se encuentran distribuidos por todo el país teniendo una mayor influencia en la zona sur y sur-este, ocupando alrededor de 456 hectáreas a cielo abierto y unos 90.000 m² de cultivo protegido. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar aislados de *Neofusicoccum parvum* mediante métodos morfológicos y de patogenicidad en plantas de *Cannabis sativa* de la variedad Fenochis. Los aislados fueron sembrados en dos medios de cultivo, PDA y AA con acículas de pino estériles. En medio PDA los aislados fueron incubados a 25 °C en oscuridad para caracterizar las colonias y producción de pigmentos a los 3, 8 y 16 días de incubación. En medio AA con adición de acículas de pino estériles se incubaron a 25 °C, con un fotoperiodo de 12 horas de luz ultravioleta cercana y fluorescente durante 7 semanas con el objetivo de favorecer la formación de estructuras y caracterizar los conidios. Posteriormente la inoculación se realizó en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía (Montevideo) utilizando tres aislados (Cluc F, Migues 1 y Migues 14), inoculando un total de 45 plantas distribuidas en tres bloques con cinco repeticiones. Los síntomas observados consistieron en necrosis a nivel de tallo, con un marchitamiento generalizado y muerte de planta con el avance de la enfermedad, en donde sobre el tejido afectado se pudo observar la producción de picnidios. De las plantas con síntomas se realizó el aislamiento a partir de picnidios en tallo coincidiendo con *N. parvum*. El presente trabajo es el primero en probar la patogenicidad de aislados de *N. parvum* en el cultivo de *C. sativa*, confirmando la presencia del cancro de tallos y ramas en Uruguay.

Palabras clave: cáñamo, *Botryosphaeriaceae*, patogenicidad

7. SUMMARY

The cultivation of cannabis is relatively new in Uruguay, having a momentum and growth from the year 2013 after the enactment of Law No. 19.172, being the first country in the world to regulate the production of cannabis for recreational, medicinal and industrial use. The crops are distributed throughout the country, having a greater influence in the south and south-east, occupying around 456 hectares in the open air and some 90.000 m² of protected cultivation. The objective of the present work was to characterize isolates of *Neofusicocum parvum* by means of morphological and pathogenicity methods in *Cannabis sativa* plants of the variety Fenochis. The isolates were planted in two culture media, PDA and AA with sterile pine needles. In PDA medium, the isolates were incubated at 25 °C in the dark to characterize the colonies and pigment production at 3, 8 and 16 days of incubation. In AA medium with the addition of sterile pine needles, they were incubated at 25 °C, with a 12-hour photoperiod of near ultraviolet and fluorescent light for 7 weeks in order to favor the formation of structures and characterize the conidia. Subsequently, the inoculation was carried out in the Phytopathology Laboratory of the Faculty of Agronomy (Montevideo) using three (Cluc F, Miguez 1 and Miguez 14), inoculating a total of 45 plants distributed in three blocks with five repetitions. The symptoms observed consisted of necrosis at the stem level, with generalized wilting and death of the plant with the advance of the disease, where the production of pycnidia could be observed on the affected tissue. Of the plants with symptoms, isolation was carried out from stem pycnidia, coinciding with *N. parvum*. This work is the first to test the pathogenicity of *N. parvum* isolates in *C. sativa* cultivation, confirming the presence of stem and branch blight in Uruguay.

Keywords: hemp, *Botryosphaeriaceae*, pathogenicity

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Abdollahzadeh, J.; Zare, R.; Phillips, A. 2013. Phylogeny and taxonomy of *Botryosphaeria* and *Neofusicoccum* species in Iran, with description of *Botryosphaeria scharifii*. Nov. (en línea). Mycologia. 105: 210 - 220. Consultado 19 oct. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.3852/12-107>
2. Agrios, G. 2007. Fitopatología. 2a. ed. México, Limusa. 838 p.
3. Alberti, I.; Prodi, A.; Nipoti, P.; Grassi, G. 2018. First report of *Neofusicoccum parvum* causing stem and branch canker of *Cannabis sativa* in Italy. (en línea). Journal of Plant Diseases and Protection. 125(3): 511 - 513. Consultado ene. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s41348-018-0174-4>
4. Bertetti, D.; Amatulli, M.; Gullino, M.; Garibaldi, A. 2011. Parassiti fungini riscontrati su piante ornamentali allevate in Italia: *Phoma* spp. su *Rudbeckia fulgida*, *Phoma aquilegiicola* su *Aquilegia flabellata* e *Botryosphaeria parva* su rodoendro. Protezione delle Colture. 1: 38 - 41. Consultado 18 nov. 2022. Disponible en <https://hdl.handle.net/2318/89321>
5. Chandra, S.; Lata, H.; Elsohly, M. A.; Walker, L. A.; Potter, D. 2016. Cannabis cultivation: methodological issues for obtaining medical-grade product. Epilepsy & Behavior. 70(2): 277 - 370.
6. Crous, P.; Slippers, B.; Wingfield, M.; Rheeder, J.; Marasas, W.; Phillips, A.; Alves, A.; Burgess, T.; Barber, P.; Groenewald, J. Z. 2006. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. Studies in Micology. 55(1): 235 - 253. Consultado 18 nov. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.3114/sim.55.1.235>
7. DGSV (Dirección General de Sanidad Vegetal, MX). 2020a. *Fusarium* spp. (en línea). México. 12 p. Consultado dic. 2022. Disponible en https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/633031/Fusarium_spp_m_a_z_2020.pdf
8. _____. 2020b. Pudrición de la raíz: *Rhizoctonia solani*. (en línea). México. 21 p. Consultado dic. 2022. Disponible en https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/600968/Pudrici_n_de_la_r_a_z.pdf
9. Fassio, A.; Rodríguez, M.; Ceretta, S. 2013. Cáñamo (*Cannabis sativa* L.). Montevideo, INIA. 88 p. (Boletín de Divulgación no. 103).
10. Feng, C.; Villarreal-Zaballos, M. I.; Ficheux, P. F.; Zima, H.; Dhillon, B. D. S.; Correll, J. C. 2020. First report of *neofusicoccum parvum* causing dieback and canker disease on hemp in the United States. (en línea). Plant Disease. 104(11): 2754 - 3089. Consultado 3 feb. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-20-0486-PDN>
11. Galarneau, E.; Lawrence, D.; Travadon, R.; Baumgartner, K. 2019. Drought exacerbates *Botryosphaeria* Dieback symptoms in grapevines and confounds

- host-based molecular markers of infection by *Neofusicoccum parvum*. Plant Disease. 103(7): 1738 - 1745. Consultado 18 nov. 2022. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1549-RE>
12. Giménez, G.; Paullier, J.; Maeso, D. 2003. Identificación y manejo de las principales enfermedades y plagas en el cultivo de frutilla. Montevideo, INIA. 51 p. (Boletín de Divulgación no. 82).
 13. Hartman, G.; Sinclair, J.; Rupe, J. 1999. Compendium of soybean diseases. 4th. ed. St. Paul, APS. 100 p.
 14. IRCCA (Instituto de Regulación y Control de Cannabis, UY). 2021. Licencias aprobadas. (en línea). Montevideo. s.p. Consultado nov. 2021. Disponible en <https://www.ircca.gub.uy/licencias-aprobadas/>
 15. Ismail, A.; Cirvilleri, G.; Lombard, L.; Crous, P.; Groenewald, J.; Polizzi, G. 2013. Characterization of *Neofusicoccum* species causing Mango Dieback in Italy. Journal of Plant Pathology. 95(3): 549 - 557. Consultado 18 nov. 2022. Disponible en <https://dx.doi.org/10.4454/JPP.V95I3.008>
 16. Lasa, C.; Smith, L. 1981. Damping-off: descripción y control. (en línea). Colonia, CIAAB. 10 p. (Miscelánea no. 32). Consultado dic. 2022. Disponible en <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/5906/1/CIAAB-Miscelanea-32-1981.pdf>
 17. Lazzizzera, C.; Frisullo, S.; Alves, A.; Phillips, A. 2008. Morphology, phylogeny and pathogenicity of *Botryosphaeria* and *Neofusicoccum* species associated with drupe rot of olives in southern Italy. Plant Pathology. 57(5): 948 - 956.
 18. Ley N° 19172. 2014. Regulación y control de cannabis. (en línea). Montevideo, IMPO. s.p. Consultado jun. 2021. Disponible en <https://www.impo.com.uy/bases/leyes/19172-2013>
 19. Linaldeddu, B.; Franceschini, A.; Luque, J.; Phillips, A. 2007. First report of canker disease caused by *Botryosphaeria parva* on Cork Oak trees in Italy. Plant Disease. 91(3): 324. Consultado 18 nov. 2022. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-91-3-0324A>
 20. McPartland, J.; Schoenweiss, D. 1984. Hyphal morphology of *Botryosphaeria dothidea* in vessels of unstressed and drought-stressed stems of *Betula alba*. Phytopathology. 74(3): 358 - 362.
 21. _____. 1992. The Cannabis pathogen project: report of the second five-year plan. Mycological Society of America Newsletter. 43(1): 43.
 22. _____. 1996. A review of *Cannabis* diseases. (en línea). Journal of the International Hemp Association. 3(1): 19 - 23. Consultado 15 abr. 2021. Disponible en <http://www.internationalhempassociation.org/jiha/iha03111.html>
 23. _____.; Clarke, R.; Watson, D. 2000. Hemp diseases and pests: management and biological control. New York, CABI. 272 p.

24. _____.; Hilling, K. 2007. Longhorn beetles and *Botryosphaeria*: a future epidemic? (en línea). Journal of Industrial Hemp. 12(2): 123 - 133. Consultado mar. 2022. Disponible en https://doi.org/10.1300/J237v12n02_09
25. Navia, O.; Plata, G.; Gandarillas, A. 2020. Estrategia de manejo de la esclerotiniosis causada por *Sclerotinia sclerotiorum* en el cultivo de girasol: la experiencia de PROINPA en Santa Cruz. (en línea). Santa Cruz, PROINPA. 8 p. Consultado dic. 2022. Disponible en <https://www.proinpa.org/web/download/estrategia-de-produccion-organica-de-girasol/#>
26. Oliveira, M.; Wang, N.; Marin, M.; Peres, N. 2019. First report of *Lasiodiplodia theobromae* and *Neofusicoccum parvum*, *N. ribis* species complex causing fruit rot on strawberry in the United States. Plant Disease. 103(5): 1037. Consultado 18 nov. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1531-PDN>
27. Pellati, F.; Brighenti, V.; Sperlea, J.; Marchetti, L.; Bertelli, D.; Benvenuti, S. 2018. New methods for the comprehensive analysis of bioactive compounds in *Cannabis sativa* L. (hemp). (en línea). Molecules. 23(10): e2639. Consultado may. 2021. Disponible en <https://doi.org/10.3390/molecules23102639>
28. Pennycook, S.; Samuels, G. 1985. *Botryosphaeria* and *Fusicoccum* species associated with ripe fruit rot of *Actinidia deliciosa* (kiwifruit) in New Zealand. Mycotaxon. 24: 445 - 458.
29. Phillips, A.; Alvez, A.; Abdollahzadeh, J.; Slippers, B.; Wingfield, J.; Groenewald, J.; Crous, P. 2013. The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. (en línea). Studies in Mycology. 98: 51 - 167. Consultado nov. 2021. Disponible en <https://doi.org/10.3114/sim0021>
30. Puig, A.; Marelli, J.; Matsumoto, T.; Keith, L.; Gutierrez, O. 2019. First report of *Neofusicoccum parvum* causing pod rot on cacao in Hawaii. Plant Disease. 103(6): 1416. Consultado 18 nov. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-18-1719-PDN>
31. Riccioni, L.; Valente, M.; Di Giambattista, T. 2017. First report of *Neofusicoccum parvum* causing shoot blight and plant decay on pomegranate in Tarquinia, Italy. Journal of Plant Pathology. 99(1): 287 - 304. Consultado 18 nov. 2022. Disponible en <https://dx.doi.org/10.4454/jpp.v99i1.3805>
32. Romero, M. 2012. Etiología, epidemiología y control del chancro de los *Quercus* causado por *Botryosphaeria spp.* Tesis Dr. Córdoba, España. Universidad de Córdoba. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes. 276 p.
33. Small, E.; Cronquist, A. 1976. A practical and natural taxonomy for *Cannabis*. (en línea). Taxón. 25(4): 405 - 435. Consultado 14 abr. 2021. Disponible en <https://doi.org/10.2307/1220524>
34. _____. 2015. Evolution and classification of *Cannabis sativa* (Marijuana, Hemp) in relation to human utilization. (en línea). The Botanical Review. no. 81:

- 189 - 294. Consultado 14 abr. 2021. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s12229-015-9157-3>
35. Spagnolo, A.; Marchi, G.; Peduto, F.; Phillips, A.; Surico, G. 2011. Detection of *Botryosphaeriaceae* species within grapevine woody tissues by nested PCR, with particular emphasis on the *Neofusicoccum parvum*, *N. ribis complex*. European Journal of Plant Pathology. 129: 485 - 500. Consultado 18 nov. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9715-9>
36. Stanley, J. 2019. Hemp plant named 'CW2A'. Patente no. USPP30,639P2. (en línea). US, United State Plant Patent. 24 p. Consultado dic. 2022. Disponible en <https://patents.google.com/patent/USPP30639P2/en>
37. UNODC (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito). 2010. Métodos recomendados para la identificación y el análisis del *cannabis* y los productos del *cannabis*. (en línea). Nueva York. 51 p. Consultado may. 2021. Disponible en https://www.unodc.org/documents/scientific/Cannabis_manual-Sp.pdf
38. Uruguay XXI, UY. 2021. Sector cannabis en Uruguay. (en línea). Montevideo. 28 p. Consultado nov. 2021. Disponible en <https://www.uruguayxxi.gub.uy/uploads/informacion/d87aa83c8dfb988f6f781ab6174ad80ae9127f70.pdf>
39. Van Niekerk, J.; Calitz, F.; Hallen, F.; Fourie, P. 2010. Temporal spore dispersal patterns of grapevine trunk pathogens in South Africa. (en línea). European Journal of Plant Pathology. 127(3): 375 - 390. Consultado 31 may 2022. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9604-2>

9. ANEXOS

Anexo no. 1: Medición de conidios aislado Cluc F.

Nº	Largo (μm)	Ancho (μm)
1	17,656	8,46
2	17,975	9,698
3	19,051	8,719
4	19,706	8,785
5	18,851	9,038
6	14,113	7,573
7	14,105	8,105
8	14,631	8,093
9	17,641	8,199
10	18,464	8,679
11	16,845	8,125
12	16,878	8,767
13	16,369	8,719
14	14,523	8,283
15	14,571	8,311
16	19,086	9,459
17	19,22	9,348
18	14,571	8,311
19	17,096	7,238
20	15,556	7,108
21	15,237	7,802
22	14,993	7,943
23	17,832	9,533
24	15,135	7,44
25	19,003	8,63
26	16,152	8,431
27	14,532	8,05
28	18,158	8,956
29	15,237	7,903
30	17,097	7,25
Promedio	16,67613333	8,3652
Max	19,706	9,698
Min	14,105	7,108

Anexo no. 2: Medición de conidios aislado Migues 1.

Nº	Largo (µm)	Ancho (µm)
1	18,233	9,529
2	19,837	8,784
3	18,931	8,321
4	14,918	7,893
5	14,629	8,014
6	16,824	8,124
7	19,214	9,33
8	15,55	7,805
9	17,631	8,207
10	18,141	9,437
11	16,858	8,671
12	19,031	8,69
13	14,571	8,311
14	14,739	8,238
15	16,87	8,76
16	16,367	8,716
17	19,114	9,246
18	18,422	8,116
19	17,566	8,45
20	14,43	8,21
21	14,982	7,593
22	19,227	9,254
23	19,118	9,554
24	17,098	7,241
25	15,655	7,128
26	16,89	8,781
27	16,47	8,82
28	15,543	7,117
29	17,532	8,009
30	19,42	9,103
Promedio	17,1270333	8,4484
Max	19,837	9,554
Min	14,43	7,117

Anexo no. 3: Medición de conidios aislado Migues 14.

Nº	Largo (µm)	Ancho (µm)
1	17,64	8,56
2	17,069	7,832
3	15,108	7,656
4	15,014	7,992
5	15,273	7,28
6	19,608	9,594
7	19,002	9,483
8	18,114	8,081
9	19,175	8,131
10	14,973	8,382
11	16,584	8,512
12	18,644	8,796
13	18,313	9,635
14	18,91	8,433
15	19,387	8,874
16	17,461	8,203
17	14,513	8,109
18	14,997	7,753
19	15,533	8,15
20	18,863	8,05
21	17,75	9,896
22	19,151	8,724
23	19,71	8,791
24	17,561	8,463
25	14,931	8,015
26	15,214	7,432
27	17,13	7,94
28	14,442	8,182
29	19,025	8,795
30	18,73	8,132
Promedio	17,2608333	8,39586667
Max	19,71	9,896
Min	14,442	7,28

Anexo no. 4: Bloque I experimento 1 (Cluc F), 7 días post inoculación.



Anexo no. 5: Bloque I experimento 2 (Migues 1), 7 días post inoculación.



Anexo no. 6: Bloque I experimento 3 (Migues 14), 7 días post inoculación.



Anexo no. 7: Bloque II experimento 1 (Cluc F), 7 días post inoculación.



Anexo no. 8: Bloque II experimento 2 (Migues 1), 7 días post inoculación.



Anexo no. 9: Bloque II experimento 3 (Migues 14), 7 días post inoculación.



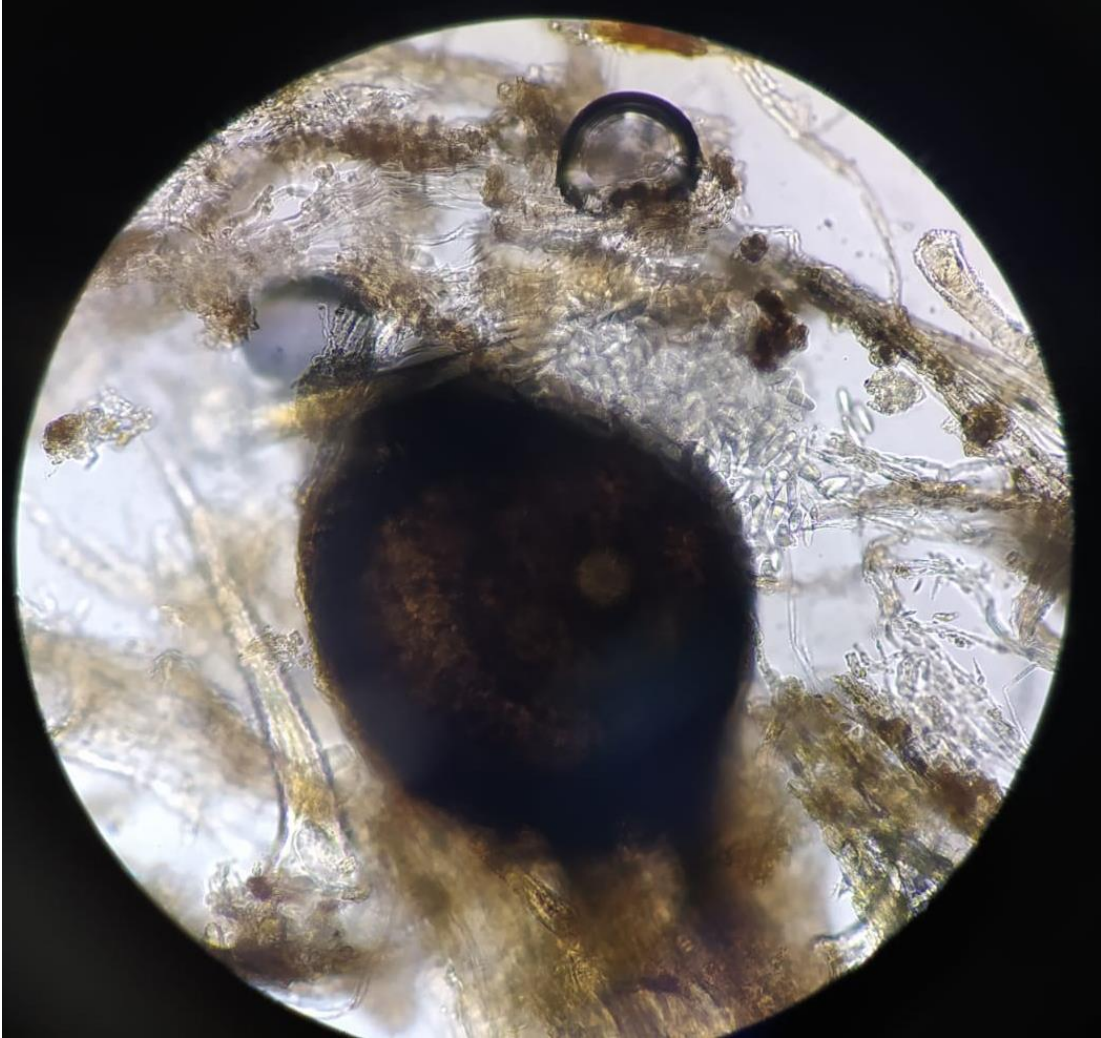
Anexo no. 10: Bloque III experimento 1 (Cluc F), 7 días post inoculación.



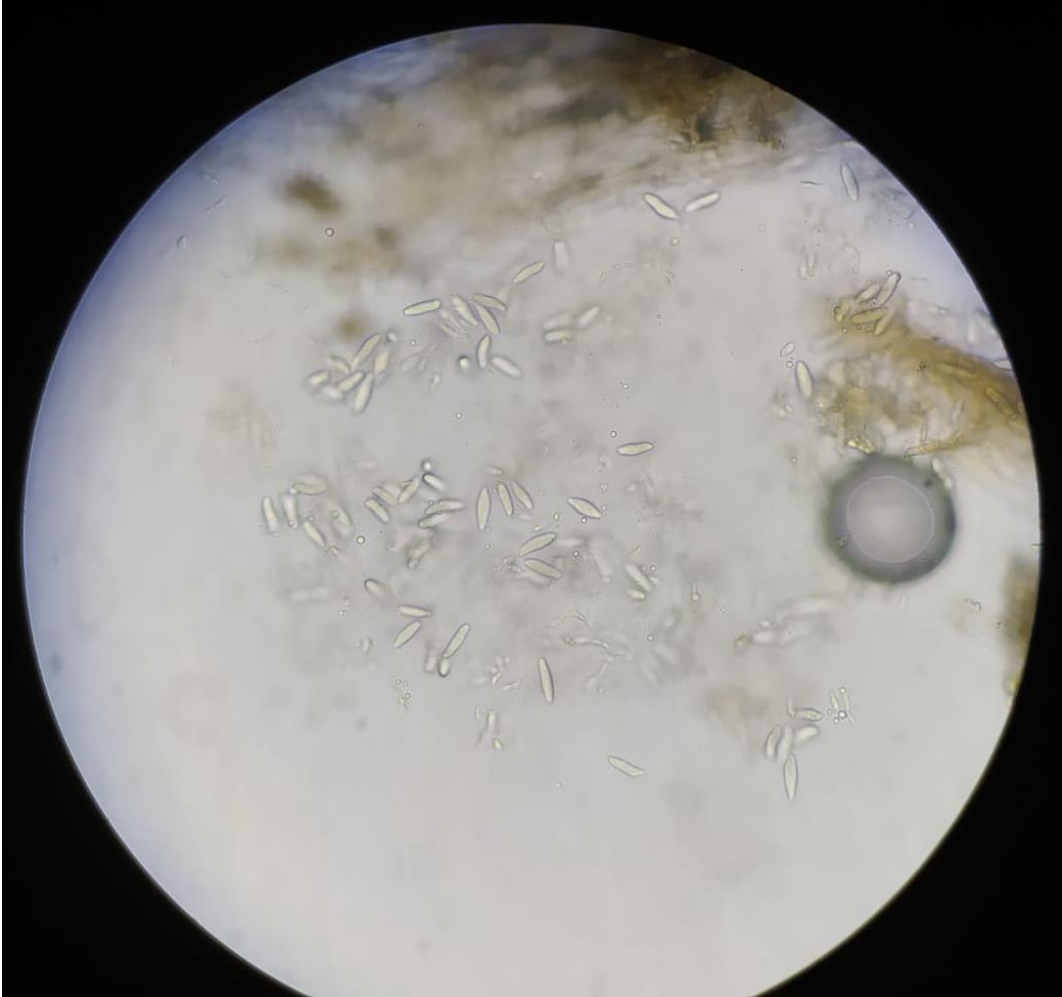
Anexo no. 11: Bloque III experimento 3 (Migues 14), 7 días post inoculación.



Anexo no. 12: Conidios y picnidio provenientes de planta inoculada con aislado Cluc F, observación en microscopio Olympus CX23 con aumento 40X.



Anexo no. 13: Conidios provenientes de picnidios de planta inoculada con aislado Míques 1, observación en microscopio Olympus CX23 con aumento 40X.



Anexo no. 14: Conidios provenientes de picnidios de planta inoculada con aislado Mígues 14, observación en microscopio Olympus CX23 con aumento 40X.

