

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

| | |
|--------------------------------------|---|
| TÍTULO DE LA ACTIVIDAD: | Protocolo base de validación y adaptabilidad para ensayos de cultivares de cáñamo (<i>Cannabis sativa</i>) con fines medicinales. |
| LOCALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD: | Estación Experimental Santa Catalina |
| RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD: | Jorge Merino (Responsable manejo de ensayos de cáñamo EESC-delegación adjunta en anexos) |
| EQUIPO MULTIDISCIPLINARIO: | Duthier López (Dirección de Investigaciones) Programas y Dptos. de la EESC |
| COLABORADORES EXTERNOS | Técnicos de empresas privadas con las que se firmen contratos de servicios especializados |



1. TÍTULO DE LA ACTIVIDAD

Protocolo base de validación y adaptabilidad para ensayos de cultivares de cáñamo (*Cannabis sativa*) con fines medicinales.

2. ANTECEDENTES

El cáñamo (*Cannabis sativa*) es una especie herbácea de la familia Cannabaceae, es una planta anual, dioica, originaria de las cordilleras del Himalaya, Asia; históricamente ha sido utilizada como medicamento, fuente de alimento y planta maestra en diversas tradiciones espirituales y culturales. También se utilizó como materia prima para la fabricación de múltiples productos tales como textiles, papel y combustible, siendo considerado como uno de los cultivos más valiosos en la Antigüedad (Fundación Daya, 2020). Contiene cientos de metabolitos especializados con bioactividad potencial, incluidos cannabinoides, terpenos y flavonoides, que se producen y acumulan en los tricomas glandulares que son muy abundantes principalmente en las inflorescencias femeninas (Andre *et al.*, 2016; Chandra *et al.*, 2017). Dado que este complejo perfil de metabolitos especializados define el potencial médico y comercial del cáñamo, la inflorescencia femenina ha atraído mucha atención (Small, 2016; Chandra *et al.*, 2017; Grof, 2018). Los cannabinoides son los metabolitos más abundantes y exclusivos de esta especie. Se conocen alrededor de 70, de los cuales el THC es el más estudiado (Flores-Sánchez, 2008). Los cannabinoides son los de mayor importancia debido a que son capaces de interactuar con todo un sistema de receptores endógenos (sistema canabinoide endógeno), además, son de naturaleza terpenofenólica y se concentran generalmente en la resina producida en los tricomas de la planta, sobre todo en las inflorescencias femeninas; los cannabinoides son sintetizados y acumulados como ácidos canabinoideos, y no es sino hasta el proceso de secado y almacenaje, que los ácidos se descarboxilan gradualmente hasta alcanzar su forma final, como por ejemplo el THC o el canabidiol (CBD) (Atakan, 2012).

Para el desarrollo correcto del cultivo se necesitan condiciones adecuadas, estas condiciones incluyen desde la selección de las semillas hasta factores ambientales como: temperatura (25-20 °C), humedad (60-70 %), fotoperiodo (de 16 h luz/ 8 h oscuridad a 12 h luz/ 12 h oscuridad) e intensidad luminosa (400-700 nm) (Cervantes, 2006). También es necesario realizar un control adecuado de plagas para asegurar su calidad (Rosenthal, 2012).

Al término de la floración, se procede a la cosecha de las plantas, para ello se cortan las ramas principales y se apartan los cogollos, tratándolos con mucho cuidado para evitar la pérdida de resina, también se apartan las hojas grandes; finalmente, se lleva a cabo el proceso de secado, que debe realizarse a la sombra, en un lugar con buena ventilación y humedad regulada, las fallas en este proceso pueden provocar que las hojas y cogollos se contaminen con hongos y que la concentración de THC disminuya (Rosenthal, 2002).



El 24 de diciembre de 2019 se publicó el Registro Oficial la Ley Orgánica Reformatoria al Código Orgánico Integral Penal del Ecuador (COIP), en donde se excluye al cannabis no psicoactivo (cannabis) de la lista de sustancias estupefacientes y psicotrópicas sujetas a fiscalización, además autoriza la siembra, cultivo y cosecha de plantas que contengan principios activos de sustancias estupefacientes y psicotrópicas, exclusivamente para la producción de medicamentos, que se expendrán bajo prescripción médica, y para investigación médico-científica.

3. JUSTIFICACION

En el Reglamento a la Ley Orgánica de Agrobiodiversidad, Semillas y Fomento de la Agricultura Sustentable en el artículo Nro. 45 se establecen los requisitos para realizar el registro de los cultivares, entre los cuales consta el informe de resultados de ensayos de validación de cultivares. Además, en dicho reglamento indica en su Sección II, Artículo 50, que los ensayos de validación de cultivares son las pruebas en campo, a las que se somete un cultivar como requisito previo al registro de cultivares, con la finalidad de verificar: 1) La adaptación a una zona agroecológica definida; 2) Validación agronómica y/o agroindustrial, según la información proporcionada en la ficha técnica del cultivar; y 3) Validación de los descriptores varietales reportados por el interesado.

Es así, que toda empresa privada, nacional o extranjera, interesada en ingresar al mercado nacional con subproductos medicinales del cannabis, debe contar con un Informe Técnico de Adaptación y Eficiencia emitido por el INIAP, sobre el comportamiento agronómico de sus cultivares, en determinada (s) zona (s) de interés de la empresa. Para el efecto, solicita al INIAP la evaluación de sus cultivares, la que se realiza mediante la firma de un contrato de servicios. Para ello, un equipo técnico de especialistas, realizará los ensayos en campo y dichas pruebas indicarán que la variedad a ser registrada cumple con los requisitos para emitir un informe técnico

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Validar el comportamiento agronómico y adaptabilidad de cultivares de cáñamo con fines medicinales.

4.2 Específicos

- Determinar el rendimiento de flor y/o biomasa de los distintos cultivares de cáñamo.
- Cuantificar las cantidades de cannabinoides como tetrahidrocannabinol (THC) y cannabidiol (CBD) producidas por los distintos cultivares de cáñamo.



- Validación de las características de la ficha técnica del varietal vs las expresadas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

A continuación, se describen los principales materiales para la implementación de los ensayos, mismos que serán definidos de manera específica en el contrato de validación, siendo el solicitante el proveedor de los materiales.

5.1.1. Material vegetal

Descripción de la semilla de los nuevos cultivares de cáñamo a evaluarse.

5.1.2. Insumos agropecuarios

Descripción de insumos requeridos para la implementación y manejo del experimento, incluyendo herbicidas, fertilizantes, insecticidas y fungicidas.

5.1.3. Materiales y equipos

Descripción de materiales y equipos necesarios para el manejo, evaluación y reporte de los resultados de la evaluación de la adaptación de cultivares de cáñamo.

5.2. Metodología

La información de las variables y el manejo de los datos serán definidos de manera específica en el contrato de validación, siendo el solicitante el proveedor de la información.

5.2.1 Características del sitio experimental

5.2.1.1 Ubicación y número de ciclos

La duración mínima de los ensayos deberá ser normalmente de dos ciclos de cultivo independientes, para corroborar y comparar resultados. Cualquier variación en el número de ciclos se definirá en el protocolo específico.

Para la ubicación se indicarán las características del sitio experimental donde se realice el experimento (Anexo 1).

5.2.1.2 Características climáticas

Se registrarán las condiciones climáticas del sitio experimental (Anexo 2).

5.2.1.3 Características edáficas

Previo a la implementación del ensayo, se realizará un análisis de suelo para conocer las características físico-químicas del mismo, como base para el manejo nutricional y riego



del cultivo, evitando restricciones nutrimentales y de agua para que los cultivos expresen sus caracteres distintivos

5.2.1.4 Cultivos

Se indicará el número de cultivos con su respectiva identificación (Anexo 3).

5.2.1.5 Diseño de los ensayos y análisis estadístico

El diseño de los ensayos de validación dependerá de dos factores

1. Si el interés es solamente por la adaptabilidad del cultivo sin tomar en cuenta aspectos investigativos, el ensayo deberá concebirse por triplicado (es decir con dos repeticiones) de tal manera que se permita la extracción de plantas o partes de plantas para efectuar medidas y conteos, sin perjudicar las observaciones que deberán efectuarse hasta el final del ciclo de cultivo. Si las semillas son feminizadas, cada ensayo de validación estará conformada por 50 plantas de cáñamo por cada cultivo, plantadas a la densidad requerida por la empresa solicitante del servicio, por lo tanto, la superficie (m^2) dependerá de la densidad de plantación. Si las semillas son regulares se incrementará un 50% en el número plantas. Se evaluarán variables agronómicas en cada repetición, a las mismas que se le aplicará estadística descriptiva.
2. Si el interés se basa en evaluar variables de investigación que implique la aplicación de tratamientos, se instalará el ensayo con un Diseño de Bloques Completos al Azar con un número de repeticiones igual o mayor a tres. El número de repeticiones y tratamientos debe ser tal, que asegure la confiabilidad estadística del ensayo (grados de libertad y coeficiente de variación aceptables). En cada repetición se evaluarán plantas tomadas al azar por cada tratamiento (el número de plantas a ser muestreadas se definirán en el protocolo específico). Los datos serán analizados mediante un análisis de varianza (ADEVA) para determinar diferencias estadísticas entre tratamientos (Anexo 4) y se aplicará la prueba de LSD al 5% para determinar diferencias entre medias. Para el análisis de datos se utilizarán paquetes estadísticos disponibles.

5.2.1.6 Factores en estudio

Detallar los factores en estudio con su respectiva descripción

5.2.1.7 Tratamientos

Si se evalúan variables de investigación que implique la aplicación de tratamientos, en el anexo 5 se describirán cada uno de los tratamientos a ser utilizados

5.3. Métodos de evaluación



La adaptabilidad del cultivar se evaluará comparando las características fisiológicas del cultivo expresadas en el ensayo, con la información proporcionada en la ficha técnica del cultivar.

5.3.1 Variables agronómicas y morfológicas.

5.3.2 Germinación

Se realizará una prueba de germinación por triplicado, evaluando 300 semillas de. Las semillas ingresarán a la cámara de germinación con las siguientes condiciones: humedad relativa 80%, temperatura 25°C (Velásquez et al, 2008).

5.3.3 Altura de planta

Se seleccionarán plantas al azar para medir (cm) la altura a los 60 y 90 días después de la emergencia (UPOV, 2012).

5.3.4 Enfermedad y/o plaga prevalente

Se muestrearán y registrarán las enfermedades y/o plagas que prevalezcan en el ensayo, para su respectivo análisis en el Departamento de Protección Vegetal.

5.3.5 Días a la floración masculina (Para cultivares regulares)

Se registrarán los días transcurridos desde la emergencia hasta que el 50% de las plantas masculinas posean la primera flor masculina abierta

5.3.6 Días a la floración femenina (cultivares regulares y feminizados)

Se registrarán los días transcurridos desde la emergencia hasta que el 50% de las brácteas en la inflorescencia estén formadas.

5.3.7 Días a la cosecha

Se contará el número de días transcurridos desde la emergencia hasta la cosecha. Para determinar el momento ideal de la cosecha es necesario guiarse por el grado de maduración de las glándulas resinosas de la planta (tricomas). Estas glándulas son de color cristalino transparente en su fase inicial, que se tornan lechosas (opacas) en su fase optima, pasando a tomar un tono ámbar – marrón, una vez que se logre esto es el momento ideal para el corte de la planta (IHEMPFARMS, 2020).

5.3.8 Rendimiento de flores: (corregidos a 13% de humedad), en 10 plantas por unidad experimental (UPOV, 2012). La corrección de humedad se realizará por descuento de humedad aplicando la siguiente igualdad (Velásquez et al, 2008).

$$\text{Peso inicial (100-humedad inicial)} = \text{peso final (100- humedad final)}$$



5.3.9 Rendimiento de Biomasa seca (hojas, tallos y flores): se pesarán 3 plantas por unidad experimental, corregidos al 13 % de humedad (UPOV, 2012). La corrección de humedad se realizará por descuento de humedad aplicando la siguiente igualdad (Velásquez et al, 2008).

$$\text{Peso inicial (100-humedad inicial)} = \text{peso final (100- humedad final)}$$

5.3.10 Contenido de THC (% en flores): Se deberá tomar una muestra (mezcla de 3 plantas por material por repetición) de los 30 cm superiores del tallo principal, en el que aparezca la inflorescencia femenina. El muestreo se realizará el día de la cosecha. Las muestras deberán secarse inmediatamente (en un plazo de 48 horas) a una temperatura inferior a 60 °C. Las muestras se secarán hasta adquirir un peso constante y una humedad comprendida entre el 8 y el 13 %. Tras el secado, las muestras se someterán a un proceso de molienda hasta obtener un tamaño de partícula < 1mm, posteriormente se colocarán en frascos plásticos en un lugar oscuro a una temperatura < 25 °C. El análisis se realizará utilizando el método AOAC 2018.11, para lo cual se extraerá el THC en etanol y se cuantificará por cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) acoplada a detector de arreglo de Diodos (DAD) a una longitud de onda de 240 nm (UNODC, 2010).

5.3.11 Contenido de CBD (% en flores): Se deberá tomar una muestra (mezcla de 3 plantas por material por repetición) de los 30 cm superiores del tallo principal, en el que aparezca la inflorescencia femenina. El muestreo se realizará el día de la cosecha. Las muestras deberán secarse inmediatamente (en un plazo de 48 horas) a una temperatura inferior a 60 °C. Las muestras se secarán hasta adquirir un peso constante y una humedad comprendida entre el 8 y el 13 %. Tras el secado, las muestras se someterán a un proceso de molienda hasta obtener un tamaño de partícula < 1mm, posteriormente se colocarán en frascos plásticos en un lugar oscuro a una temperatura < 25 °C. El análisis se realizará utilizando el método AOAC 2018.11, para lo cual se extraerá el CBD en etanol y se cuantificará por cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) acoplada a detector de arreglo de Diodos (DAD) a una longitud de onda de 240 nm (UNODC, 2010).

5.4 Manejo específico del experimento

El manejo específico del experimento dependerá directamente del paquete tecnológico que entregará el contratante del servicio de validación; sin embargo, de no contar con esta especificidad se aplicará el siguiente estándar:

5.4.1 Siembra

Las semillas de cáñamo se sembrarán a 0,5 a 1 cm, por debajo de la superficie del sustrato, que se debe de mantener húmedo sin llegar a estar encharcado hasta que las



plántulas emerjan sobre la superficie. La germinación se produce entre 48 a 72 horas y la emergencia de las plántulas tendrá lugar entre 4 y 7 días después de la germinación.

5.4.2 Fertilización

Se entregarán los nutrientes necesarios de acuerdo al análisis de suelo o sustrato

5.4.3 Fases del cultivo

5.4.3.1 Crecimiento vegetativo

Una vez que las plántulas emergen sobre la superficie del suelo, éstas se desarrollarán en altura, ampliando a la vez su sistema radicular y creando ramas laterales en la parte superior, aumentando el porte de la planta. En su región de origen (Europa Central) la fase de crecimiento abarca desde el momento de la emergencia de las plantas (Abril-Mayo) hasta el mes de Julio, donde se reducen las horas de sol disponibles y comienzan la fase de floración.

5.4.3.2 Fase de floración

Cuando las plantas entren a la fase de floración empezarán a mostrar sus órganos reproductivos (pre flores y flores). Para un cultivo de cáñamo destinado a la producción de inflorescencias, para extractos ricos en CBD y terpenos, se debe evitar la polinización de las flores femeninas. Durante esta fase el cultivo necesitará un aporte extra de fosforo y potasio para obtener inflorescencias de mayor tamaño y peso. Los ejemplares masculinos serán identificados y eliminados antes de que puedan producir polen. El periodo entre el momento en que es posible distinguir las flores masculinas, hasta que éstas liberen el polen, es de una a dos semanas, por lo que es fundamental adaptar la superficie de cultivo a la mano de obra disponible, para realizar esta tarea en ese tiempo.

5.4.4 Cosecha:

El momento ideal de la cosecha se determina por el grado de maduración de las glándulas resinosas de la planta (tricomas). Estas glándulas son de color cristalino transparente en su fase inicial, que se tornan lechosas (opacas) en su fase optima, pasando a tomar un tono ámbar – marrón, una vez que se logre esto es el momento ideal para el corte de la planta.

El producto deseado (inflorescencias femeninas no polinizadas) se encuentra siempre en la mitad superior de la planta y en los extremos de las ramas laterales principales. Éstas son las partes de las plantas que se cortarán y procesarán.

Al momento de la cosecha se deben eliminar los tallos y las hojas grandes que no contienen resinas, este proceso se conoce como “manicura o manicurado” y es conveniente hacerlo cuando la planta está aún fresca, también es posible hacerlo con la



planta seca, pero el proceso es más laborioso y pesado. El secado de lo cosechado ha de realizarse bajo techo, ya que la luz solar provoca la degradación de las moléculas de CBD. Se debe preparar un espacio cubierto bajo techo, para el secado con suficiente aeración y condiciones adecuadas que eviten la aparición de mohos y podredumbre de post cosecha.

6. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

En el anexo 6, se detallarán las actividades a realizarse durante los dos ciclos del cultivo.

7. PRESUPUESTO

Se deberá elaborar un presupuesto en base a los insumos requeridos para la implementación y manejo del experimento.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andre, C. M., Hausman, J. F., and Guerriero, G. (2016). Cannabis sativa: the plant of the thousand and one molecules. *Front. Plant Sci.* 7:19. doi: 10.3389/fpls.2016.00019

Atakan Z. Review. Cannabis, a complex plant: different compounds and different effects on individuals. *Ther Adv Psychopharmacol.* 2012; 6(2): 241-254.

Chandra, S., Lata, H., Khan, I. A., and ElSohly, M. A. (2017). "Cannabis sativa L.: botany and horticulture" in Cannabis sativa L.–Botany and biotechnology. ed. S. Chandra (New York, NY: Springer), 79–100.

Flores-Sánchez I, Verpoorte R. Secondary metabolism in Cannabis. *Phytochem Rev.* 2008; 7(3): 615-639.

Fundación Daya, 2020. Cannabis medicinal: una breve guía sobre usos y efectos. Consultado el: 24 de septiembre de 2020. Disponible en: <http://www.fundaciondaya.org/cannbis-medicnal-usos-efectos-tipos-de-cannabis/>

Grof, C. P. L. (2018). Cannabis, from plant to pill. *J. Clin. Pharmacol.* 84, 2463–2467. Doi 10.1111/bcp.13618

IHEMPFARMS, 2020. Protocolo para la ejecución de Pruebas de Evaluación Agronómica de genotipos de Cannabis Sativa L. con fines Industriales Fibras, Alimentación y Medicinales. pp 10.

Rosenthal E. Marihuana en interior. El sencillo arte del cultivo. Murcia: Catellarte S.L; 2002, p 43-56.

Rosenthal E. Marijuana pest and disease control. Oakland: Quick American Publishing; 2012.



Small, E. (2015). Evolution and classification of Cannabis sativa (Marijuana, Hemp) in relation to human utilization. Bot. Rev. 81, 189–294. doi: 10.1007/s12229-015-9157-3

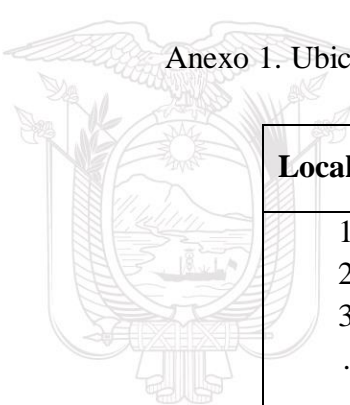
UNODC, 2010. Métodos recomendados para la identificación y el análisis del cannabis y los productos del cannabis, manual para uso de los laboratorios nacionales de estupefacientes. New York. 64 pp. ISBN 978-92-1-348147-9.

UPOV (Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales). 2002. Introducción General al examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad y a la elaboración de descripciones armonizadas de las obtenciones vegetales. TG/1/3. Ginebra, Suiza. 28 p

Velásquez, J., Monteros, A., y Tapia B., C. (2008). Semillas, tecnología de producción y conservación. Quito, Ecuador: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Departamento de Producción de Semillas.

10. ANEXOS

Anexo 1. Ubicación del experimento.



| Localidad | Parroquia | Cantón | Coordenadas geográficas | |
|-----------|-----------|--------|-------------------------|----------|
| | | | Latitud | Longitud |
| 1 | | | | |
| 2 | | | | |
| 3 | | | | |
| . | | | | |
| . | | | | |
| n | | | | |

Anexo 2. Condiciones climáticas del sitio experimental.

| Localidad | Altitud | Zona Climática | Temperatura Promedio | Precipitación media anual | Humedad relativa promedio | Heliofanía |
|-----------|---------|----------------|----------------------|---------------------------|---------------------------|------------|
| 1 | | | | | | |
| 2 | | | | | | |
| . | | | | | | |
| . | | | | | | |
| n | | | | | | |



Anexo 3. Cultivares del ensayo de adaptación de cultivares de cañaño.

| Cultivar | Descripción |
|----------|-------------|
| 1 | |
| 2 | |
| 3 | |
| . | |
| . | |
| n | |

Anexo 4. Esquema del ADEVA, por localidad:

| Fuentes de variación | Grados de libertad |
|----------------------|--------------------|
| Tratamientos | t-1 |
| Repeticiones | r-1 |
| Error experimental | (t-1)(r-1) |
| Total | t*r-1 |
| C.V.= | |
| Promedio= | |

Anexo 5. Descripción de los tratamientos a ser evaluados.

| Tratamiento | Descripción |
|-------------|-------------|
| T1 | |
| T2 | |
| . | |
| . | |
| Tn | |

Anexo 6. Cronograma de actividades por ciclo de producción

| ACTIVIDADES | MESES | | | | |
|--|-------|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Elaboración de protocolo y presentación a comité técnico | | | | | |
| Preparación de invernadero | | | | | |
| Preparación terreno | | | | | |
| Siembra | | | | | |
| Labores culturales | | | | | |
| Cosecha | | | | | |



| | | | | | |
|--------------------------------|--|--|--|--|--|
| Pos cosecha | | | | | |
| Registro de datos | | | | | |
| Análisis de datos | | | | | |
| Elaboración de informe técnico | | | | | |

Anexo 7. .- Designación oficial para manejo de ensayos de cáñamo en la EESC

Memorando Nro. INIAP-DGCC-2020-0224-MEM

Quito, D.M., 30 de julio de 2020

PARA: Srta. Ing. Doris Alicia Tixe Parra
Directora de Producción y Servicios, Encargada

ASUNTO: Delegación Ensayos de validación Cultivar XVLIII-01 de cáñamo

En respuesta al Memorando Nro. INIAP-DPSE-2020-0284-MEM de 28 de julio de 2020, mediante el cual solicita designar personal técnico a fin de establecer un ensayo para la validación agronómica del cultivar XVLIII-01 de cáñamo en diferentes localidades y zonas agroecológicas del Ecuador.

Me permito comunicar que se designa al ingeniero Duthier Alfredo López Domínguez, y al doctor Jorge Luis Merino Toro, para que asistan a la reunión virtual planificada para el jueves 30 de julio de 2020, a partir de las 10h00.

Agradeceré por favor, remitir el link respectivo para la reunión a los e-mail institucionales de los técnicos delegados.

Atentamente,

Dr. Raul Ernesto Jaramillo Velastegui
DIRECTOR DE INVESTIGACIONES

Referencias:
- INIAP-DPSE-2020-0284-MEM

Copia:
Sr. Ing. Duthier Alfredo Lopez Dominguez
Analista de Investigaciones 3

Sr. Dr. Jorge Luis Merino Toro
Analista de Planificación EESC

Sr. Ing. Luis Fernando Rodriguez Iturralde
Director E.E. Santa Catalina

