



universidad
de león

TESIS DOCTORAL

Control de oídio (*Podosphaera macularis*) y
fusariosis (*Fusarium* spp.) en lúpulo y
desarrollo de inoculantes de semilla y suelo
basados en bioeconomía circular

Alejandra J. Porteous Álvarez

Programa de Doctorado en Ingeniería de Biosistemas

Tutor: Pedro A. Casquero

Directores

Dr. Pedro A. Casquero y Dra. Sara Mayo Prieto

León, 2023



universidad
de león

TESIS DOCTORAL

Control de oídio (*Podosphaera macularis*) y fusariosis (*Fusarium* spp.) en lúpulo y desarrollo de inoculantes de semilla y suelo basados en bioeconomía circular

Alejandra J. Porteous Álvarez

Programa de Doctorado en Ingeniería de Biosistemas

Tutor: Pedro A. Casquero

Directores

Dr. Pedro A. Casquero y Dra. Sara Mayo Prieto

León, 2023

Agradecimientos

Quisiera dedicar un espacio a todas aquellas personas que me han apoyado en la elaboración de esta tesis. En primer lugar, quiero agradecer a mi familia por darme el espacio y contexto adecuados para que la educación académica fuese accesible.

En segundo lugar, a mis tutores Pedro Casquero y Sara Mayo. Pedro, gracias por apostar por mí desde un principio e impulsarme en toda mi trayectoria académica, sobre todo cuando a mí me costaba verla. Sara, gracias por haber sido, ante todo, buena compañera con la que trabajar siempre ha sido un placer. Tu apoyo, desde que empecé, ha sido fundamental. Gracias al grupo GUIIAS, el grupo de investigación que me ha ayudado a crecer y ser quien soy en lo académico, valoro el sentimiento de compañerismo que se ha demostrado a lo largo de los años y agradezco la acogida que siempre recibo. Gracias a vosotros, Sara, Álvaro y Guzmán por servirme de ejemplo al empezar y transmitirme los valores de compañerismo y trabajo en equipo que creo que se han mantenido hasta ahora. Gracias a todas las que han venido después, Sara, Alexia, Laura, Daniela, Natalia, Mercedes, Víctor y Rocío que os sumasteis al trabajo siempre, con el humor que nos caracteriza a cada uno. En particular, gracias, Laura, por los momentos de despacho compartidos en el último año, gracias por servir de desahogo cuando el ordenador o alguna situación se aliaba en contra. Gracias al grupo del café por servir de desconexión a media mañana, sin vosotros y esos momentos el día a día habría sido muy distinto. Gracias a todos por hacer que agrícolas siga siendo segunda casa.

Quisiera agradecer a mis amigos por su apoyo incondicional y que, aunque me haya aislado por épocas, siempre me han recibido de vuelta con los brazos abiertos. En particular, gracias, María, por estar a mi lado durante todos estos años, quién nos iba a decir con 3 años que con 30 seguiríamos así, gracias por tu apoyo emocional y técnico siempre que lo he necesitado. Gracias, Sandra, por tu apoyo y personalidad que ha hecho que las semanas sean menos duras y más amenas. Gracias Lorena, por ser inspiración y orgullo. Gracias María, por incluirme en tu vida, y, siendo el apoyo más importante durante la carrera, has seguido siéndolo desde entonces también en la vida. Gracias al grupo SanFroi, por sumarse a cualquier plan o concierto, habéis hecho que mi necesidad por cultura y amistades siempre esté cubierta. Me siento muy afortunada de estar rodeada de gente como vosotros que ante todo está para apoyar en las peores y para celebrar en las mejores.

Gracias a mi madre, por haberme dado siempre la libertad de pensar y hacer lo que creyese conveniente, me has educado en el trabajo y la responsabilidad, pero al mismo tiempo me has enseñado a disfrutar de las oportunidades que da la vida. Gracias por protegerme y al mismo tiempo darme alas para descubrir el mundo.

Y, gracias a todos aquellos que, aunque no haya nombrado con nombre propio, habéis compartido momentos felices conmigo y habéis contribuido a que de una forma u otra este camino haya sido más llevadero y mucho más interesante.

Financiación

La presente tesis se ha podido llevar a cabo gracias a la obtención de una beca del Programa de Ayudas para la Formación de Profesorado Universitario (FPU2019/03650) del Ministerio de Universidades por la Orden del 7 de octubre de 2020.

Índice

Índice	1
Índice de Figuras	2
Índice de Tablas	3
Resumen	5
Abstract	7
Introducción	9
Lúpulo (<i>Humulus lupulus</i> L.).....	11
Plagas y enfermedades del lúpulo.....	18
Agricultura sostenible	28
Bioeconomía circular	33
Referencias	36
Justificación y Objetivos	49
Capítulo 1	53
“Green strategies of powdery mildew control in hop: from organic products to nanoscale carriers”	55
Capítulo 2	57
“Native <i>Trichoderma</i> isolates from soil and rootstock to <i>Fusarium</i> spp. control and growth promotion of <i>Humulus lupulus</i> L. plantlets”	59
Material suplementario	61
Capítulo 3	71
Patente: “Recubrimiento de semilla que comprende un agente de biocontrol y conos de lúpulo”	73
Discusión	95
Conclusiones	115
Conclusions.....	117
Perspectivas de futuro	119

Índice de Figuras

Figura 1 Producción de lúpulo seco de los diez países con mayor producción a nivel mundial y el porcentaje de las variedades aromáticas y amargas en cada país. Datos de IHGC (2022). Figura de elaboración propia.	12
Figura 2 Distribución de la producción de lúpulo en España en 2020 según los datos estadísticos del MAPA (2021). Figura de elaboración propia.	14
Figura 3 Diversidad de variedades cultivadas en León. Datos del centro certificador 06. Figura de elaboración propia.	14
Figura 4 Taxonomía de <i>Humulus lupulus</i> L. Figura de elaboración propia.	15
Figura 5 Hojas de la planta de lúpulo con (a) 1, (b) 3 y (c) 5 lóbulos. (d) planta de lúpulo con aptitud trepadora y giro a derechas. Sección de la flor del lúpulo en la que se observa (e) el raquis, (f) las glándulas de lupulina y (g) la bráctea con una semilla. Imágenes propias.	15
Figura 6 (a) Plantación de lúpulo al inicio de la temporada con disposición de dos trepas por planta, en V. (b) órganos florales de plantas femeninas. (c) Cono o inflorescencia femenina, (d) planta femenina con los conos formados. Imágenes propias.	17
Figura 7 (a) <i>Tetranychus urticae</i> , (b) <i>Phorodon humuli</i> , (c) <i>Aglionia</i> , y los síntomas causados por (d) <i>Pseudoperonospora humuli</i> , (e) <i>Podosphaera macularis</i> y (f) <i>Fusarium</i> spp. (a, b, f) Imágenes de (Lorenzana de la Varga y Romero Cuadrado, 2023) y (c, d, e) propias.	20
Figura 8 Taxonomía del género <i>Fusarium</i> . Figura de elaboración propia.	22
Figura 9 Taxonomía de <i>Podosphaera macularis</i> . Figura de elaboración propia.	25
Figura 10 Daños causados por <i>Podosphaera macularis</i> en (a) las hojas del lúpulo, (b) antes de que se forme la flor, (c y d) en los conos. (e) conos de lúpulo sanos y (f) conos de lúpulo infectados. Imágenes propias.	27
Figura 11 Taxonomía del género <i>Trichoderma</i> . Figura de elaboración propia.	31
Figura 12 Esquema de los pasos consecutivos del ensayo de confrontación directa. El disco de color verde representa al agente de control biológico (BCA) y el disco de color morado al patógeno. “R” y “r” representan las medidas tomadas en la evaluación de inhibición.	102

Figura 13 Ensayo de membrana a) Esquema de los pasos consecutivos del ensayo de membrana. El disco de color beige representa el medio de cultivo, el de color azul la membrana de celofán, el de color verde representa al agente de control biológico (BCA) y el de color morado al patógeno; b) *Trichoderma* spp. sobre la membrana de celofán; desarrollo de *Fusarium sambucinum* sobre c) una placa control y d) tras retirar la membrana con desarrollo de *Trichoderma* spp. 103

Figura 14 a-e) Pasos consecutivos para obtener planta nueva a partir de material vegetal de la parte aérea por reproducción vegetativa; f) Crecimiento en cámara de cultivo de plántula de lúpulo; g) Ejemplo de plántula de lúpulo al inicio de los ensayos de promoción de crecimiento con un tallo de cinco-seis nudos. 105

Índice de Tablas

Tabla 1 Productos a base de agentes de control biológico (BCA) autorizados en el Registro de productos fitosanitarios (MAPA, 2023) según su acción. 30

Tabla 2 Lista de tratamientos, nombre comercial del producto y materia activa aplicados en los ensayos de campo para el control de *Podospaera macularis* descritos en el Capítulo 1 98

Tabla 3 Aislamientos de *Trichoderma* y *Fusarium* recolectados de parcelas de lúpulo de la provincia de León descritos en el Capítulo 2. 101



Resumen



Resumen

El lúpulo es una planta perenne de gran interés en la industria cervecera que se ve seriamente afectada por oídio (*Podosphaera macularis*) y *Fusarium* spp. En los últimos años se han retirado muchas materias activas del Registro de Productos fitosanitarios. Su retirada afecta a la sanidad del cultivo y a su rendimiento económico.

La presente tesis tiene como objetivos mejorar la sostenibilidad del cultivo del lúpulo con aplicaciones que mejoren sanidad y fomenten la bioeconomía circular.

Se han ensayado los principales tratamientos para el control de oídio disponibles en el mercado. Los tratamientos de residuo cero y de control biológico han sido capaces de controlar el desarrollo de la enfermedad en hoja. Los tratamientos con hidrogenocarbonato de potasio, azufre y el agente de biocontrol *Bacillus amyloliquefaciens* han controlado la enfermedad en hoja al nivel de tratamientos convencionales con productos de síntesis química. El uso de la nanotecnología ha conseguido controlar la enfermedad con una reducción del 30% de la dosis comercial del producto fitosanitario de síntesis química. Estos resultados ofrecen una perspectiva positiva para desarrollar un sistema de control sostenible de la enfermedad en condiciones de campo.

Se ha explorado la presencia de agentes autóctonos de biocontrol en parcelas de lúpulo. Se han evaluado once aislamientos autóctonos de *Trichoderma* en ensayos in vitro, de confrontación directa y de membrana, para evaluar su capacidad de antagonismo frente a *Fusarium* spp. y en ensayos en planta para evaluar la promoción de crecimiento. Los aislamientos de *T. hamatum* T311 y T324, *T. virens* T312 y *T. gamsii* T327 han mostrado un control efectivo de los aislamientos de *Fusarium* evaluados y junto con *T. rossicum* T328 y *T. harzianum* T329 han promovido el desarrollo de plántulas de lúpulo.

Los residuos de cosecha del lúpulo suponen hasta un 70% en peso de la producción total. Se han evaluado distintos residuos de este cultivo como inoculantes para el desarrollo de agentes de control biológico en recubrimiento de semilla. El uso de polvo de residuos de cono ha favorecido el desarrollo del agente de biocontrol *T. harzianum* T019 y el porcentaje de germinación y biomasa de las semillas evaluadas. El uso de este inoculante ha servido para revalorizar los residuos del lúpulo fomentando así la bioeconomía circular del cultivo.

Con esta tesis doctoral se inician dos líneas de trabajo, la exploración de tratamientos alternativos para el control de oídio y fusariosis, y la revalorización de residuos como soporte de microorganismos para el control biológico.

Abstract

Hops are a perennial plant of great interest in the brewing industry that is seriously affected by powdery mildew (*Podosphaera macularis*) and *Fusarium* spp. Many active ingredients have been withdrawn from the Registry of phytosanitary products in the last few years. Their withdrawal has a detrimental effect on the health and economic performance of the crop.

The objective of this thesis is to improve the sustainability of hop cultivation with applications that enhance crop health and promote the circular bioeconomy.

The main powdery mildew control treatments available on the market have been tested. Zero residue and biological control treatments prevented the development of the disease on leaves. Treatments with potassium hydrogen carbonate, sulfur, and the biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* controlled the leaf disease incidence similarly to conventional products with chemical synthesis products. The use of nanotechnology managed the disease with a 30% reduction in the commercial dose of the chemically synthesized phytosanitary product. These results provide a positive perspective for developing a sustainable alternative to control the disease under field conditions.

Hop fields were explored for the presence of autochthonous biocontrol agents. Eleven autochthonous isolates of *Trichoderma* were evaluated in vitro by direct confrontation and membrane assays to assess their antagonism capacity against *Fusarium* spp. and in plant trials to evaluate growth promotion. The isolates of *T. hamatum* T311 and T324, *T. virens* T312, and *T. gamsii* T327 showed effective control of the *Fusarium* isolates evaluated and, together with *T. rossicum* T328 and *T. harzianum* T329, promoted hop plantlet growth.

Hop harvest residues account for up to 70% of total production. Different residues were tested as inoculants for the development of biological control agents in seed coating. Cone residue powder favored the development of the biocontrol agent *T. harzianum* T019 and increased the percentage of germination and biomass of the evaluated seeds. The application of this inoculant promotes the circular bioeconomy of the crop, revaluing its residues.

With this doctoral thesis, there are two lines of work begging: the exploration of alternative treatments for the control of powdery mildew and fusariosis, and the revaluation of residues that support microorganisms' development for biological control.



Introducción



Introducción

Lúpulo (*Humulus lupulus* L.)

Origen y aprovechamientos

El lúpulo (*Humulus lupulus* L.) es una planta trepadora de la familia Cannabaceae que se cultiva a nivel mundial por su producción de compuestos químicos con un interés en las industrias cervecera y farmacéutica principalmente.

H. lupulus es nativo de Europa, Norteamérica y Asia y, en la actualidad, se cultiva de forma habitual entre las latitudes 35° y 55° de ambos hemisferios. La domesticación de la planta se cita sólo en el hemisferio norte (Murakami *et al.*, 2006). Hasta el siglo IX, el lúpulo, y en particular los conos, se usaba como planta medicinal. Si se utilizaba para la elaboración de bebidas, su uso no estaba tan demandado como para cultivarlo y sólo se empleaba el que crecía de forma salvaje. Durante la Edad Media, la utilización del lúpulo en la cerveza comenzó a popularizarse, expandiéndose en el siglo XVI en Inglaterra, América del Norte (siglo XVII) y en el hemisferio Sur, en Australia y Nueva Zelanda (siglo XVIII). A mediados del siglo XIX, los alemanes introdujeron el cultivo de variedades europeas de *H. lupulus* en regiones de China, Japón o Corea, desplazando a las variedades japonesas (Delyser and Kasper, 1994).

El lúpulo se empleaba para proteger las levaduras del pan y evitar que fuesen contaminadas por bacterias. Con ese mismo fin se introdujo en la elaboración de la cerveza, para preservar el producto, incluso en algunas elaboraciones especiales se introducía doble cantidad de lúpulo para proteger el producto durante viajes largos a la India, como es el caso del tipo de cerveza “Indian Pale Ale” (Cornell, 2010). Actualmente se investiga la realidad antimicrobiana del lúpulo para otras aplicaciones más allá de la cervecera.

Se ha observado que los extractos de lúpulo derivados de las glándulas de lupulina tienen efectos antibióticos hacia las bacterias Gram-positivas pero no contra las Gram-negativas. Los β -ácidos se utilizan en la industria azucarera o en la elaboración de etanol para controlar las fermentaciones alcohólicas (Pollach *et al.*, 2002; Leite *et al.*, 2013). En la industria farmacéutica, los β -ácidos han demostrado ser efectivos para controlar *Helicobacter pylori* (Marshall *et al.* 1985) Goodwin *et al.* 1989 (Čermák *et al.*, 2015) y los α - y β -ácidos para controlar la enfermedad fúngica de pie de atleta (Langezaal *et al.*, 1992) o infecciones bacterianas que causan acné y neurodermatitis (Biendl, 2009; Weber *et al.*, 2019).

En el siglo XVII se cita que las virtudes del lúpulo se manifiestan en las cervezas que lo incluyen frente a las que no lo llevan, éste hace que la bebida ayude a mantener el cuerpo sano y no solo quitar la sed (Neve, 1991). De los compuestos que se han identificado se habla del Xanthohumol, del que se citan beneficios potenciales contra el cáncer, diabetes, hepatitis C o malaria (Biendl, 2009). Actualmente, en la industria farmacéutica el

extracto seco de lúpulo se utiliza en combinación con valeriana para la producción de fármacos del grupo hipnóticos y sedantes, recomendados para combatir síntomas de estrés mental y combatir problemas ocasionales del sueño (Vidal Vademecum Spain, 2023). Se dice que el lúpulo puede tener influencia sobre la melatonina y la valeriana sobre la adenosina y que su combinación influye en los problemas de insomnio (Biendl, 2009).

Actualmente, aunque sus usos se están diversificando, el mayor porcentaje de lúpulo comercializado se hace para las industrias cerveceras pues, a partir de 1516 con la Ley de Pureza (*Reinheitsgebot*), se establece que la cerveza sólo se puede elaborar con tres ingredientes, agua, cebada malteada y lúpulo, aunque hoy en día, este ingrediente no se utiliza con la finalidad de preservante, sino que está principalmente ligado al amargor y aroma que le aportan sus resinas y aceites esenciales.

Producciones e importancia

Según la última reunión del comité económico de IHGC (*International Hop Growers' Convention*) el 4 de noviembre de 2022 (IHGC, 2022), durante la campaña del 2021 se cosecharon 60.466 ha de lúpulo con una producción total de 129.779 t de conos secos. El comité establece además una distinción entre variedades amargas y aromáticas. En el 2021 se destinó casi un 70% de la superficie de lúpulo a cultivar variedades aromáticas y más de un 30% a las variedades amargas. Estiman que, en los últimos 10 años, la superficie destinada a variedades aromáticas ha aumentado en 17.270 ha mientras que la superficie destinada a variedades amargas se ha reducido en 1.959 ha.

En cuanto a la distribución por países, en la Figura 1 se muestran los diez principales países productores mundiales de lúpulo de 2021 según IHGC y el porcentaje correspondiente a variedades aromáticas y amargas dentro de cada país. EE. UU. y Alemania son los mayores productores con más de un 77% de la producción mundial. El 70% de la

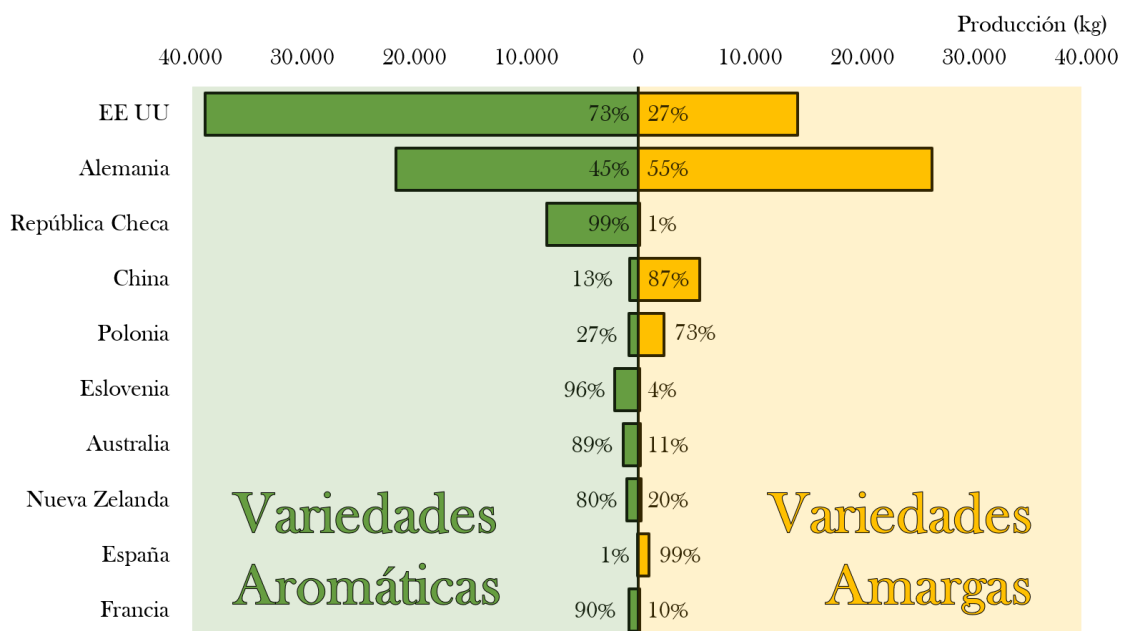


Figura 1 Producción de lúpulo seco de los diez países con mayor producción a nivel mundial y el porcentaje de las variedades aromáticas y amargas en cada país. Datos de IHGC (2022). Figura de elaboración propia.

producción de EE. UU. se concentra en el estado de Washington en el noroeste del país en el valle de Yakima. En Alemania, el 83% de la superficie se concentra en la región de Hallertau en Baviera. Según IHGC, en 2021 España era el 9º país del mundo en producción de lúpulo con 960 t.

Según la base de datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) (FAO, 2021) se han localizado algunos errores en la información que proporciona. La FAO destaca a Etiopía como uno de los países con mayor producción de lúpulo, al nivel de EE. UU. y Alemania. Según la bibliografía consultada (Berhanu, 2014; Zewdu and Tsehail, 2023), este error puede deberse a la nomenclatura que se da en Etiopía a la planta. En Etiopía, “hops” o lúpulo lo utilizan como nombre común para la especie arbustiva *Rhamnus prinoides*. Aquí, esta planta se utiliza de forma similar al lúpulo (*H. lupulus*) en la elaboración de la cerveza (Berhanu, 2014), de ahí que compartan el nombre común y haya podido servir como error en la base de datos. Otras diferencias en los datos de esta base de datos son debidas a la falta de información por parte del país. La FAO, dentro de los países con mayor producción de lúpulo, posiciona a la República Popular Democrática de Corea, aunque por latitud es posible que tenga producción de lúpulo, tras una revisión de la información en la web y bases de datos no se ha encontrado información oficial que corrobore dicha estimación a tan alta producción. La base de datos también estima que Albania es un país con mayores producciones que España, Reino Unido, Australia o Nueva Zelanda, pero no hay información oficial que pueda corroborarlo, todo lo contrario, ya que se considera que la producción en este país es minoritaria en comparación con los productores medios. Por otro lado, hay países que sí que están cultivando lúpulo, pero no se encuentran recogidos en la base de datos de la FAO. Es el caso de Canadá, Chile, Bulgaria o Brasil, que, aunque todavía a niveles muy por debajo de los medianos productores, sí hay datos de su producción tanto en las webs gubernamentales como en la base de datos de IHGC.

Según la información del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España (MAPA, 2021) en 2020 se produjeron 1.024 t de lúpulo seco, ocupando el 9º puesto de producción mundial según IHGC. En 2020, El 90% de la producción del lúpulo de España se encontraba en la provincia de León con 921 t. En esta provincia tradicionalmente se ha cultivado la mayor proporción de lúpulo. Hace 20 años, en el 2003 se produjeron 1.312 t de lúpulo seco en España, de los cuales 1.305 t (99%) se produjeron en León y 7 t en La Rioja. En 2013, en España se produjeron 868 t, de las cuales 849 t (98%) se produjeron en León, 3 t en Palencia, 12 t en La Rioja y 4 t en Navarra. En 2014 se introdujo el cultivo en Lérida, pero León seguía produciendo el 98% del lúpulo nacional. En 2018, hace 5 años, el cultivo en Cataluña tenía más presencia, produciendo 36 t (4%) de las 915 t nacionales y León pasó a producir el 95% (865 t). En los últimos datos estadísticos publicados hasta el momento la producción nacional de lúpulo sigue estando mayoritariamente en León, en un 90%, pero hay más provincias que se suman a la producción de este cultivo. Se representa en la Figura 2 la distribución por provincias. Las grandes cerveceras favorecen el cultivo de lúpulo de proximidad, Estrella de Levante en la región de Murcia y Estrella de Galicia en la región de La Coruña.

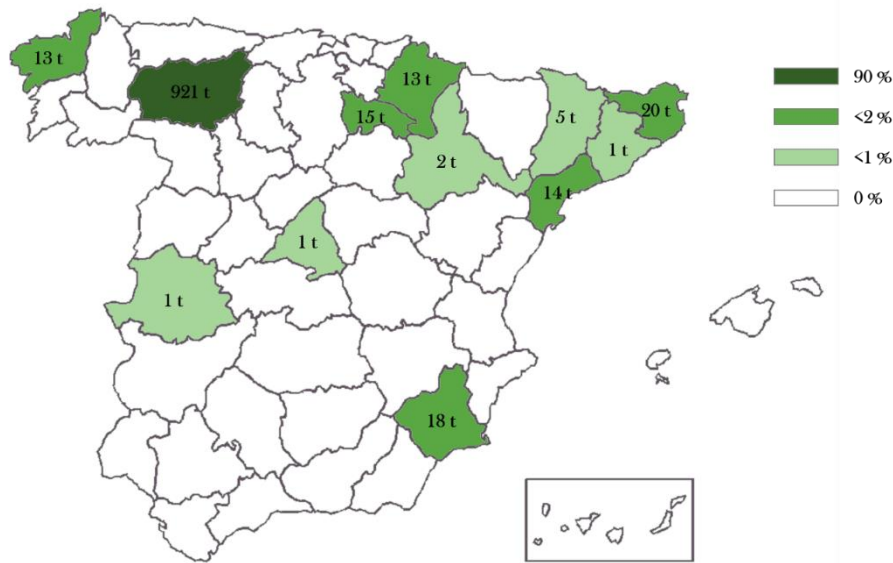


Figura 2 Distribución de la producción de lúpulo en España en 2020 según los datos estadísticos del MAPA (2021). Figura de elaboración propia.

El lúpulo en España principalmente se comercializa a través de la empresa Hopsteiner. Se estima que en torno a un 10% del lúpulo que se produce en León no lo hace por esa vía (mayormente las variedades distintas a Nugget). Según los datos de un centro certificador que controla la emisión de certificados de gran parte de lúpulo que se comercializa por otras vías, en 2022 se cosecharon en León 10 variedades distintas de Nugget. Del lúpulo certificado en la campaña de 2022, el 80% pertenecía a la variedad Nugget y del 20% restante, las variedades mayoritarias eran Cascade (44%), Chinook (11%) y Columbus (35%) (Figura 3) (Datos no publicados).

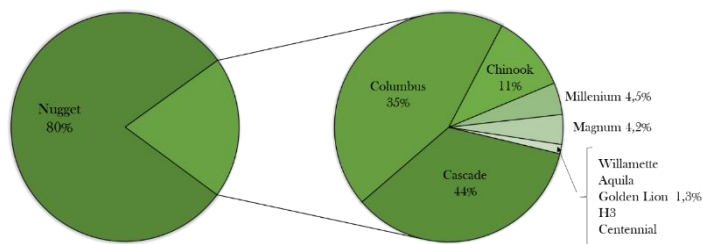


Figura 3 Diversidad de variedades cultivadas en León. Datos del centro certificador 06. Figura de elaboración propia.

Según el informe de IHGC 2022 (IHGC, 2022) el 99% de la producción de lúpulo de España se hace de variedades amargas mientras que solo el 1% corresponde a variedades aromáticas.

Taxonomía y Morfología

El género *Humulus* pertenece a la familia Cannabaceae (Figura 4), en la que se pueden encontrar otros géneros como *Cannabis*, con especies de importancia comercial como *Cannabis sativa* L. Y dentro del orden Urticales, en la que se encuentran especies como la ortiga, *Urtica dioica* L. (Neve, 1991).

La planta del lúpulo es dioica, perenne y trepadora. Las plantas que se cultivan para su aprovechamiento económico son las plantas con flores femeninas, ya que las masculinas quedan reservadas para usar en metodologías de mejoramiento genético y obtención de nuevas variedades.

Su aptitud trepadora la consigue con una superficie recubierta de tricomas simples y bifurcados (Small, 1978; Catalán, 2006) que hace las funciones de velcro y sujeción. El tallo gira en sentido de las agujas del reloj (Figura 5) en torno a elementos verticales para desarrollarse en altura (Neve, 1991). La disposición de las hojas suele ser pareada. Son de borde aserrado y forma cordada con 1, 3 o 5 lóbulos (Figura 5). El haz escábrida presenta tricomas cristolíticos (Catalán, 2006). Las flores femeninas se disponen en inflorescencia por pares alrededor del eje principal denominado raquis. En cada nudo se dispone una flor protegida por dos bractéolas y a su vez éstas por dos brácteas (Neve, 1991; Catalán, 2006). Esta disposición hace que la forma de la flor tenga un aspecto de estróbilo o piña

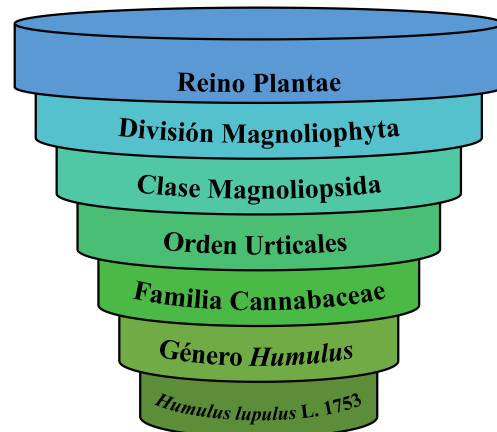


Figura 4 Taxonomía de *Humulus lupulus* L. Figura de elaboración propia.

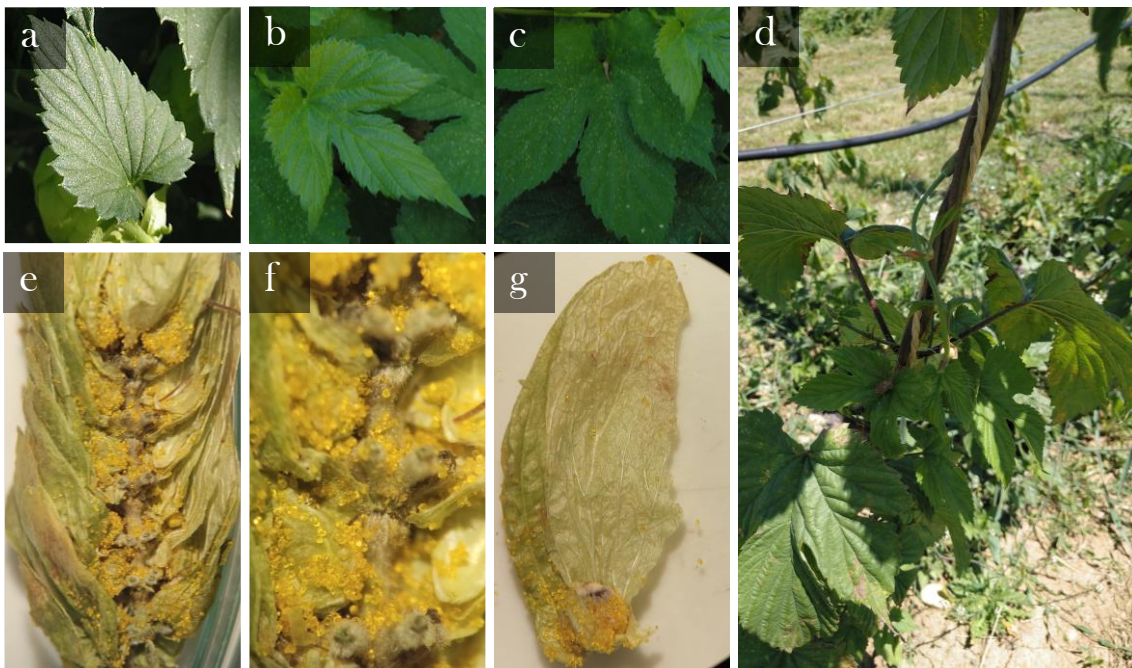


Figura 5 Hojas de la planta de lúpulo con (a) 1, (b) 3 y (c) 5 lóbulos. (d) planta de lúpulo con aptitud trepadora y giro a derechas. Sección de la flor del lúpulo en la que se observa (e) el raquis, (f) las glándulas de lupulina y (g) la bráctea con una semilla. Imágenes propias.

denominado comúnmente cono. En la madurez, contiene numerosas glándulas de lupulina que producen resinas y aceites esenciales de interés (Figura 5) (Neve, 1991).

Las sustancias que producen las flores femeninas de las plantas de lúpulo se clasifican en tres grupos: resinas, aceites esenciales y polifenoles. Dentro de las resinas se diferencian dos tipos, las resinas blandas, generalmente de color amarillo y viscosas y las resinas duras que suelen tener un color más oscuro. Las resinas blandas se dividen en α -ácidos (humulonas) y β -ácidos (lupulonas) y a su vez en sus isómeros. Estas resinas, y en particular los α -ácidos, constituyen el componente del lúpulo que aporta amargor a la cerveza. En las resinas duras se encuentran algunos polifenoles de interés en otras aplicaciones más allá de la industria cervecera, por ejemplo, el Xanthohumol, con posible actividad contra el cáncer o la diabetes (Biendl, 2009).

Los aceites esenciales que se producen en las glándulas de lupulina de los conos, son la fracción de aromas volátiles. Según la composición de la variedad, esta fracción es la que aporta aromas a la cerveza. Por tanto, la selección de variedades para el empleo en la industria cervecera se ve influenciada por la composición de resinas y aceites esenciales para seleccionar variedades amargas o aromáticas, respectivamente. Dentro de las variedades amargas se encuentran cultivares como Magnum, Herkules, Nugget, Millennium, Columbus. Dentro de las variedades aromáticas están Perle, Tradition, Saaz y Cascade (Almaguer *et al.*, 2014).

Cultivo del lúpulo

El lúpulo es una planta herbácea perenne y dioica. Para su explotación se requiere hacer una planificación exhaustiva, teniendo en cuenta que la plantación no va a entrar en plena producción hasta al menos 3 años desde su implantación. Esto requiere, por tanto, prever qué variedades o ecotipos de lúpulo van a ser de interés para la industria pasado ese tiempo. La inversión que supone una plantación nueva de lúpulo es alta, primero por ese retardo en la recuperación de la inversión y, por otra parte, la instalación de los elementos necesarios para el correcto desarrollo en altura de una planta de esta envergadura.

Los países con mayor producción de lúpulo se han decantado por instalaciones permanentes de entutorado formadas por postes y alambres que permiten a la planta alcanzar alturas de 6 m de altura. Se disponen postes de forma vertical a lo largo de la parcela en los cuales se anclan alambres que unen los postes de forma horizontal tanto arriba como al nivel del suelo. Cuando la planta brota en primavera se atan entre los alambres cuerdas verticales u oblicuas según la disposición de la plantación que sirven de guía a la planta (Figura 6). La distancia entre líneas suele ser entre 3 m y 3,2 m y la distancia entre plantas de 1,1 m a 1,5 m, con densidades de plantación en torno a 2.200 plantas/ha (Magadán *et al.*, 2011).

El lúpulo es una planta exigente en cuanto a humedad, requiere que, al menos, haya precipitaciones, y, si el agua de lluvia no es suficiente, suplementarlo con agua de riego. En sistemas de riego por goteo se recomiendan 250 l/m² durante la temporada de desarrollo (Magadán *et al.*, 2011). En cuanto a temperaturas, este cultivo se desarrolla adecuadamente en climas templados, con temperaturas que oscilan entre 13-25°C. Si la temperatura del aire supera los 30°C con baja humedad relativa durante periodos continuados puede suponer un estrés para la planta (Donner *et al.*, 2020).

Una vez se hace la plantación, se puede mantener por lo menos 15 años, y en algunos casos superar ese periodo (Magadán *et al.*, 2011). La parte aérea de la planta decae cuando los días comienzan a acortarse, pero el rizoma o sistema radicular permanece perenne. A partir de marzo, cuando los días empiezan a alargarse, de las yemas latentes del tallo vegetativo enterrado bajo suelo comienzan a brotar nuevos tallos trepadores. Si sale un mayor número de tallos trepadores que los deseados, se debe realizar una poda, seleccionando entre tres o cinco tallos por trepa. Trepa es la denominación común que recibe el crecimiento conjunto de tallos trepadores que se enredan en torno a una cuerda guía.



Figura 6 (a) Plantación de lúpulo al inicio de la temporada con disposición de dos trepas por planta, en V. (b) órganos florales de plantas femeninas. (c) Cono o inflorescencia femenina, (d) planta femenina con los conos formados. Imágenes propias.

Según el diseño de la plantación se pueden dejar una, dos o tres trepas por planta. En la labor de poda se aprovecha para conducir los tallos en las guías y que sigan su crecimiento girando en sentido de las agujas del reloj, facultad que adquieren cuando la planta ha desplegado el segundo par de hojas (Enz *et al.*, 1998). Antes de comenzar el crecimiento longitudinal pueden empezar a desarrollar los brotes laterales que desencadenan en tallos de segundo orden. Cuando la planta ha adquirido la longitud del tallo principal total, aparecen los brotes con órganos florales (Figura 6). Con el paso del tiempo, éstas van desarrollándose en inflorescencias y por fin en los conos. Una vez adquirido el tamaño del cono, éste debe madurar hasta que las cabezuelas estén cerradas y se desarrollen por completo las características organolépticas del mismo. El cono se considera maduro cuando la lupulina adquiere un tono amarillento y se han desarrollado los aromas propios de la variedad. Es, entonces, momento de cosechar el producto. En España suele hacerse durante la última quincena de agosto y la primera de septiembre, según la variedad.

Para la cosecha de lúpulo se emplea una maquinaria denominada comúnmente peladora. Consiste en una máquina que, por medio de dientes metálicos, bandejas inclinadas y ventiladores, separa los conos de flor de las hojas y tallos de la planta (Magadán *et al.*, 2011). De la peladora se extraen en varias fracciones, por un lateral los conos, por otro las hojas y las brácteas y bractéolas que se han desprendido de los conos con menor peso y por otro las trepas deshojadas.

En campo el cono de lúpulo se recoge con aproximadamente un 70% de humedad. Para que el producto sea apto para la comercialización, el cono debe reducir su contenido en humedad por debajo de 12% (Diario Oficial de la Unión Europea, 2006). Para ello se emplean secaderos. Actualmente el lúpulo se seca de forma indirecta, en un secadero pasa aire caliente con velocidad a través de una masa de conos lo que hace que al paso de unas horas esa masa reduzca su humedad a los valores deseados. El lúpulo seco se prepara para la venta bien en formato de flor o bien en pellet.

Plagas y enfermedades del lúpulo

La planta del lúpulo, como muchos otros cultivos, se ve afectado por la presencia de microorganismos, artrópodos, virus y viroides que pueden causar enfermedades o plagas, desencadenando problemas en el cultivo ya sea por una limitación del desarrollo o por pérdidas en la producción o valor comercial del producto cosechado.

Dentro de los artrópodos que pueden ser plaga del lúpulo destacan la araña roja, el pulgón, y lepidópteros defoliadores. La araña roja común (*Tetranychus urticae* Koch) es una plaga polífaga (Neve, 1991; Lorenzana de la Varga and Romero Cuadrado, 2023). En el lúpulo, se alimenta del contenido celular de las hojas y conos, haciendo que pierdan su color verde característico y en su lugar se observan zonas blanquecinas. Los síntomas, que se agravan con temperaturas medias más altas, provocan una reducción de la tasa fotosintética en las hojas y una reducción del valor comercial de los conos. Para el control de esta plaga se puede emplear fitoseidos como métodos de control biológico (Neve, 1991; Mahaffee *et al.*, 2009; Woods *et al.*, 2021; Lorenzana de la Varga and Romero Cuadrado, 2023).

El pulgón del lúpulo (*Phorodon humuli* Schrank) es otra plaga de gran importancia de este cultivo. Los adultos y las ninfas se alimentan del contenido celular de las hojas y

conos, que hace que las hojas se vuelvan amarillentas o los conos adquieran tonalidades marrones (Mahaffee *et al.*, 2009; Lorenzana de la Varga and Romero Cuadrado, 2023). Otro de los síntomas comunes causados por la presencia de pulgones es la presencia de melaza sobre las superficies de la planta que puede llegar a devaluar por completo el valor comercial de los conos (Lorenzana *et al.*, 2010). Los pulgones, a su vez, con su forma de alimentación pueden ser vectores transmisores de virus (Lorenzana de la Varga and Romero Cuadrado, 2023).

Dentro de los lepidópteros defoliadores hay dos grupos, *Xylena exsoleta* L. y *Aglais io* L. y *Polygonia c-album* L. En el caso de *X. exsoleta*, es una especie polífaga, de carácter secundario, que puede tener trascendencia en primavera cuando la planta no ha terminado de desarrollar, ya que puede alimentarse de la guía impidiendo su desarrollo vertical (Lorenzana de la Varga and Romero Cuadrado, 2023). *A. io* y *P. c-album* se alimentan de lúpulo y ortiga, aunque se pueden encontrar en otros cultivos. Se alimentan de las hojas adultas dejando solo las nervaduras y rodeándolas con nidos sedosos en la que se alberga larvas, mudas y deyecciones. En algunas zonas puede desencadenar daños de gran importancia (Lorenzana de la Varga and Romero Cuadrado, 2023), aunque en la provincia de León no es reseñable su incidencia.

Dentro de los nemátodos, el más importante que puede afectar al lúpulo es *Heterodera humuli* Filipjev, el nemátodo del quiste del lúpulo. La sintomatología característica es una proliferación de raíces en la que se pueden encontrar los quistes (hembras muertas con huevos en su interior). Todo ello supone una reducción del vigor de las plantas haciendo que sean más sensibles al estrés abiótico y que, por consecuencia, se reduzca la producción y valor comercial de los conos (Mahaffee *et al.*, 2009; Lorenzana de la Varga and Romero Cuadrado, 2023).

Las principales enfermedades fúngicas en lúpulo son el mildiu, oídio, verticilosis y fusariosis (Figura 7). El mildiu en lúpulo está causado por *Pseudoperonospora humuli* (Miyabe & Takah.) G.W. Wilson. Es la enfermedad que mayor incidencia causa a nivel global (Purayannur *et al.*, 2021; Barth Haas, 2022). Puede afectar a cualquier parte de la planta, siendo más notorio en primavera, con el primer desarrollo de la planta, cuando se observa un crecimiento reducido de los brotes con acortamiento de entrenudos y clorosis en las hojas. La infección en tallos jóvenes puede suponer la detención del crecimiento. Cuando la enfermedad está avanzada hay riesgos de infección secundaria, observándose en las hojas una masa de esporangios. Si la infección secundaria es sistémica se observan manchas angulares de color verde pálido en las hojas y los pedúnculos con un aspecto aceitoso (Lorenzana de la Varga and Romero Cuadrado, 2023). La infección podría detener la formación de conos y si es posterior decolorarlos, devaluando en producto (Purayannur *et al.*, 2021).

La verticilosis puede estar causada por *Verticillium dahliae* Kleb. o *V. nonalfalfae* Inderbitzin, H.W. Platt, Bostock, R.M. Davis & K.V. Subbarao (antes *V. albo-atrum*). Es una enfermedad vascular que penetra en la planta bien por las raíces o a través de heridas, bloqueando el movimiento de agua y nutrientes a través de la planta y produciendo toxinas. Los síntomas que se observan van desde un decaimiento de la planta, colapso de los tallos laterales, con hojas amarillentas hasta la necrosis en los nervios (Štajner *et al.*, 2013; Kunej *et al.*, 2021; Lorenzana de la Varga and Romero Cuadrado, 2023). Puede darse la enfermedad con cepas de hongo letales o no letales. Con las últimas, la plantación podría recuperarse la campaña siguiente (Radišek *et al.*, 2006).



Figura 7 (a) *Tetranychus urticae*, (b) *Phorodon humuli*, (c) *Aglios io*, y los síntomas causados por (d) *Pseudoperonospora humuli*, (e) *Podosphaera macularis* y (f) *Fusarium* spp. (a, b, f) Imágenes de (Lorenzana de la Varga and Romero Cuadrado, 2023) y (c, d, e) propias.

Otra de las enfermedades con importancia agronómica es el oídio, causado por *Podosphaera macularis* (Wallr.) U. Braun & S. Takam (antes *Sphaerotheca macularis*). El síntoma principal es el desarrollo de colonias blanquecinas de micelio en las hojas y conos (Lorenzana de la Varga and Romero Cuadrado, 2023). El mayor impacto de la enfermedad aparece cuando el inóculo alcanza las inflorescencias, la formación del cono se puede ver afectada bien sólo en una decoloración o bien en una deformación completa en los casos más graves, causando la pérdida de la producción (Royle, 1978; Alejandra J. Porteous-Álvarez *et al.*, 2021).

En cuanto a la Fusariosis, distintas especies pueden causar la enfermedad en lúpulo con distintas sintomatologías, aunque lo más habitual es encontrarse la enfermedad afectando a la base de la planta (Neve, 1991). Por lo general, *Fusarium* es un hongo que afecta al sistema radical y causa enfermedades vasculares. En lúpulo, el hongo penetra en la planta a través de heridas, comúnmente en el rizoma o tallos al nivel del suelo. Éste coloniza los haces vasculares en la base provocando un bloqueo en el transporte de nutrientes, por lo que se observa un marchitamiento en la parte vegetativa y un engrosamiento del tallo por encima del punto de infección debido a la acumulación de nutrientes bloqueados. En el punto de infección se produce un estrechamiento del tallo, esa diferencia de diámetros, con viento o acción mecánica, puede provocar que la trepa se rompa (Neve, 1991; Gryndler *et al.*, 2008). Si la infección es muy severa se puede observar micelio blanquecino-rosado alrededor del tallo y coloraciones rojizas en los haces vasculares (Lorenzana de la Varga and Romero Cuadrado, 2023). Si, por el contrario, el hongo afecta al cono, se observa una necrosis en la punta que avanza hacia el raquis (Pethybridge *et al.*, 2001; Bienapfl *et al.*, 2005).

En apartados posteriores se desarrollará con más detenimiento la Fusariosis y el Oídio, dos de las enfermedades con las que se ha trabajado en la elaboración de esta tesis.

En cuanto a los virus que pueden afectar al lúpulo algunos son sintomáticos y otros aún de forma asintomática pueden afectar al normal desarrollo y producción de la planta. Entre ellos se han descrito el Virus del mosaico del manzano (ApMV) (Pethybridge *et al.*, 2002). La infección por ApMV suele producirse por medio de material vegetal y dentro de la parcela por medios mecánicos. Si la infección es sintomática, pueden aparecer manchas cloróticas anulares o líneas sinuosas en las hojas haciendo la forma de una hoja de roble (Pethybridge *et al.*, 2008). El Virus del mosaico de Arabis (ArMV) puede transmitirse por el nemátodo *Xiphinema diversicaudatum* Micoletzky. La infección por ArMV se puede manifestar con distintas sintomatologías, en primavera, con los primeros brotes pudiendo crecer con coloración oscura, débiles y más tardíos, con entrenudos cortos y sin la habilidad de trepar por la guía. En las hojas se pueden observar manchas translucidas o de coloración amarilla en las regiones internerviales por donde, conforme crece la hoja, se rompen o clorosis con una deformación de su desarrollo en las hojas basales (Pethybridge *et al.*, 2008). El Virus de los anillos necróticos de los *Prunus* (PNRSV) (Bock, 1966), y el Complejo Carlavirus que incluye el Virus americano latente del lúpulo (AHLV), el Virus latente del lúpulo (HpLV) y el Virus del mosaico del lúpulo (HpMV) (Postman *et al.*, 2005; Pethybridge *et al.*, 2008). El Complejo Carlavirus puede transmitirse por el pulgón *P. humuli* (Pethybridge *et al.*, 2008). Suele ser asintomático, pero se puede manifestar con una decoloración de las nerviaciones principales o moteado clorótico de las hojas y una curvación de los bordes. Las plantas infectadas suelen presentar un desarrollo más enano, reducción en la producción de conos y con tendencia a desprenderse de la guía y caerse (Thresh, 2006; Pethybridge *et al.*, 2008).

En cuanto a viroides, se han citado el Viroide latente del lúpulo (HLVd), Viroide del enanismo del lúpulo (HSVd) y el Viroide de la corteza agrietada de los cítricos (CBCVd). Su propagación suele ser por el material vegetal infectado y, posteriormente, dentro de la parcela por transmisión mecánica. La presencia de viroides puede presentar síntomas como una reducción del tamaño y desarrollo de las plantas, clorosis o coloración anómala de las hojas y reducción del tamaño, cantidad y calidad de los conos (Pethybridge *et al.*, 2008).

***Fusarium* spp. en lúpulo**

El género *Fusarium* se describió en el siglo XIX por Link (Figura 8), pero su incidencia y daños se citan desde el siglo V a.C. (Schoental, 1994). Puede causar enfermedades tanto en humanos, animales como en plantas bien por su acción directa o por producir micotoxinas o metabolitos secundarios tóxicos. Muchas especies de este género suponen un gran impacto como agentes causales de enfermedades vegetales que conducen a grandes pérdidas de producción y económicas. La mayor parte de las plantas cultivadas tienen, al menos, una enfermedad asociada a la presencia de *Fusarium* (Leslie and Summerell, 2006). La sintomatología asociada a su presencia puede ser muy variada, incluyendo pudrición de raíces, tallos, frutos y semillas, chancros, marchitamientos, o enfermedades foliares (Leslie and Summerell, 2006).

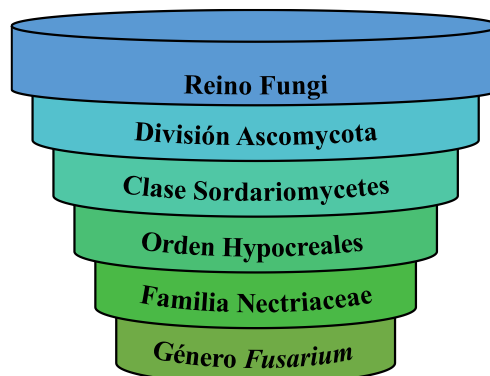


Figura 8 Taxonomía del género *Fusarium*. Figura de elaboración propia.

Los caracteres morfológicos de *Fusarium* spp. son una limitación a la hora de su identificación, pues carece de muchos que se puedan usar para diferenciar las especies. Generalmente se utiliza la forma de las macroconidias para su identificación morfológica a nivel de especie, pero son caracteres subjetivos que se pueden ver modificados bajo condiciones ambientales diferentes. Con los avances en la filogenética, la identificación taxonómica de las especies se puede hacer por técnicas moleculares. En la actualidad, para la identificación taxonómica de *Fusarium* spp. se suelen emplear secuencias genómicas de los genes responsables de la β -tubulina (*tub-2*), del factor de elongación 1- α (*tef-1*), de la histona H3 o regiones codificadoras de RNA mitocondrial ribosomal. Aunque puede llegar a ser un problema en la identificación y taxonomía de algunos aislados, por lo general, en muchas especies de importancia agronómica, la identificación de aislados basado en caracteres morfológicos y alguna de las regiones genómicas puede ser suficiente (Leslie and Summerell, 2006).

Fusarium es un hongo que habita naturalmente en muchos ambientes incluyendo el suelo agrícola o sus cultivos. En plantas enfermas se pueden encontrar distintos aislados del mismo género actuando como fitopatógenos primarios o secundarios, o como saprófitos o endófitos. Son hongos de reproducción asexual y, en muchos casos, no se ha descrito ningún teleomorfo.

Las especies dentro del género *Fusarium* que pueden afectar al lúpulo son distintas y están citadas por varios autores, incluyendo a *F. avenaceum*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. sambucinum*, *F. verticilloides*, (Pethybridge *et al.*,

2001; Bienapfl *et al.*, 2005; Levic *et al.*, 2009; Pscheidt and Ocamp, 2021). En la elaboración de esta tesis se ha trabajado con tres de estas especies, *F. culmorum*, *F. oxysporum* y *F. sambucinum*. Se han aislado de parcelas y muestras vegetativas sintomáticas de lúpulo en la provincia de León.

F. culmorum (Wm.G. Sm.) Sacc. puede confundirse con *F. sambucinum*, puesto que crece en regiones y cultivos similares, también se puede encontrar en cereales. No se ha detectado teleomorfo, aunque se sospecha que pueda ser una especie heterotálica, para completar la fase sexual necesita estar en contacto con una pareja compatible. Puede producir micotoxinas como las moniliforminas, que son tóxicas en animales, o bien tricotecenos y fusarina C, tóxicos para los animales y las plantas. En su identificación morfológica, en medio de cultivo patata-dextrosa-agar (PDA) crece tiñendo el medio de cultivo de rojo y su desarrollo es naranja pálido oscureciendo con su desarrollo. Produce abundantes macroconidias con 3 o 4 septos y la forma característica de medialuna siendo las células apicales redondeadas. En cambio, no se ha demostrado que produzca microconidias (Leslie and Summerell, 2006). En lúpulo se cita como agente causal del chancro o marchitamiento (Sabo *et al.*, 2002).

F. oxysporum Schltdl. es la especie más cosmopolita del género. En la mayoría de los cultivos provoca una enfermedad vascular asociada a su presencia. La especie suele subdividirse en *formae speciales* al ser agentes patógenos de un hospedador específico. No se ha descrito teleomorfo. Para su identificación morfológica, en cultivo en medio PDA desarrolla pigmentos violetas que colorean el medio. Produce abundantes microconidias, y de forma menos abundante, macroconidias. *F. oxysporum* generalmente produce metabolitos secundarios, aunque no están descritos como micotoxinas. Dentro de la especie *F. oxysporum* algunos aislados se han propuesto como agentes de control biológico ya que pueden ser fitopatógenos de plantas (Lobulu *et al.*, 2021), componentes importantes de suelos supresivos capaces de reducir o eliminar la enfermedad diana (Forsyth *et al.*, 2006) o inducir la resistencia sistémica en las plantas diana (Porteous-Álvarez *et al.*, 2020). Se ha aislado de lúpulo causando una sintomatología de marchitamiento.

F. sambucinum Fuckel es una especie que pertenece al complejo de especies de *Fusarium sambucinum* (*Fusarium sambucinum* species complex FSAMSC) que incluye varias especies relacionadas biológica y taxonómicamente, entre los que se encuentran *F. redolens* o *F. avenaceum*. Se asocia con el teleomorfo *Gibberella pulicaris* (Fries) Saccardo var. *pulicaris*. Puede ser huésped de distintas especies vegetales. Produce micotoxinas, entre las que destaca la producción de tricotecenos, fusarina C y ácido fusárico, tóxico para plantas y animales (Bacon *et al.*, 1996; Leslie and Summerell, 2006). En medio de cultivo PDA crece de forma irregular con una pigmentación del medio generalmente amarilla, naranja o roja. Si la colonia crece de forma circular, podría indicar una degradación del aislado. Produce abundantes macroconidias con entre 3 y 5 septos con la forma característica de medialuna cuyas células apicales terminan en punta. La formación de microconidias es escasa (Leslie and Summerell, 2006). En lúpulo, la presencia de *F. sambucinum* se asocia a la enfermedad del chancro del lúpulo y la necrosis de la punta del cono (Bienapfl *et al.*, 2005).

Los efectos negativos de la producción de micotoxinas por las especies de *Fusarium* pueden suponer un problema no solo para el cultivo, sino también para la seguridad alimentaria y humana. Al desarrollarse sobre la planta, el hongo puede producir micotoxinas que pueden afectar a su desarrollo o almacenarse en el producto y transmitirlo a eslabones

siguientes. El consumo de cereales infectados con *Fusarium* ha desencadenado en enfermedades en animales de granja, atribuidas a las micotoxinas (Morgavi and Riley, 2007). En muestras de lúpulo se han identificado micotoxinas de *Aspergillus* spp., no se han realizado análisis para evaluar la presencia de micotoxinas en conos producidas por *Fusarium* (Morgavi and Riley, 2007).

Hasta el momento, la influencia y daños causados por *Fusarium* en lúpulo se basan en el impedimento del normal desarrollo de la planta o influencia sobre la cosecha. La sintomatología en lúpulo causada por estas especies puede incluir chancro en el rizoma, marchitamiento de la planta o necrosis en la punta del cono.

Bienapfl et al. (2005) demostraron, mediante los postulados de Koch, que *F. sambucinum* y *F. avenaceum* causaban necrosis apical en los conos de lúpulo. Pethybridge et al. (2001) cita a *F. crookwellense* también como agente causal de la necrosis apical del cono. En la punta del cono formado, se observan cambios de coloración que pasan de verde a colores marrones hasta que se necrosa. La enfermedad avanza de la punta hacia el interior del cono. La necrosis se aprecia también en el raquis. Tiende a afectar más en parcelas con alta humedad o con exceso de riego, pero en general, la incidencia de esta enfermedad en las parcelas cultivadas de lúpulo es baja. Por este motivo, se no se han desarrollado métodos de control específicos para esta infección y se recomiendan métodos usados para el control del chancro del lúpulo (O´Neal et al., 2015).

El chancro del lúpulo también está asociado a *F. sambucinum*. La detección de esta enfermedad suele ser tardía ya que la planta se marchita de forma súbita ya que sus daños suelen estar asociados a enfermedades vasculares. Se ha identificado a *F. sambucinum*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. meridionale* como agentes causales del marchitamiento o chancro del lúpulo (Sabo et al., 2002; Pscheidt and Ocamb, 2021; Pinto et al., 2022). El síntoma principal del chancro es un estrechamiento en el punto de unión entre el tallo y la corona del rizoma que causa en la parte superior inmediata un engrosamiento del tallo por la acumulación de nutrientes. La enfermedad no se presenta de forma homogénea en toda la parcela, ni todos los años con la misma intensidad. Sin embargo, suele estar asociada a periodos húmedos o exceso de humedad. Se puede llegar a observar micelio blanco-rosado sobre el tejido vegetativo al que está afectando y en los haces vasculares una coloración rojiza. La incidencia de esta enfermedad en las plantaciones de lúpulo en general es baja, pero pueden surgir presiones más altas si existe una combinación de factores, por ejemplo, con material infectado con viroides, HSVd (O´Neal et al., 2015). El hongo está presente en los suelos e infecta a las plantas por medio de heridas y aperturas naturales al nivel del suelo (Lorenzana de la Varga and Romero Cuadrado, 2023).

Se recomienda adoptar una serie de medidas para reducir la propagación de la enfermedad en plantaciones de lúpulo, tales como minimizar las posibles heridas ocasionadas durante las labores mecánicas y proteger la planta de roturas causadas por el viento, además de utilizar material vegetal libre de viroides. En la actualidad, en España, el MAPA sólo permite la aplicación de *T. asperellum* T34 mediante “Uso menor autorizado por procedimiento nacional”. Dicha autorización no garantiza la posible interacción entre el agente de biocontrol y la planta. Hasta la fecha no se ha trabajado previamente con la interacción entre *Trichoderma* y *H. lupulus*, aunque si hay estudios previos que ofrecen resultados positivos para el control de *Fusarium* con *Trichoderma* en distintos cultivos (Blaya et al., 2013; Martínez-Medina et al., 2014; Błaszczuk et al., 2017; Álvarez-García et al., 2020; Ji, Liu, et al., 2021; Mironenka et al., 2021).

Oídio (*Podospaera macularis*) en lúpulo

Podospaera macularis (Wallr.) U. Braun & S. Takam. (antes *Sphaerotheca macularis* (Wallr.) W.B. Cooke) es un hongo de la familia Erysiphaceae (Figura 9), en la que hay diferentes géneros y especies que provocan las enfermedades comúnmente llamadas oídios (Powdery mildew en inglés), enfermedad muy común en muchas plantas cultivadas. Todos ellos presentan una sintomatología similar, lo que ha llevado a que se les denomine de una forma común. Producen micelio y conidios en la superficie de las hojas que tienen un aspecto de polvo blanco, de ahí su nombre en inglés powdery mildew. Son patógenos obligados, es decir, que necesitan crecer sobre material vegetal vivo (Glawe, 2008).

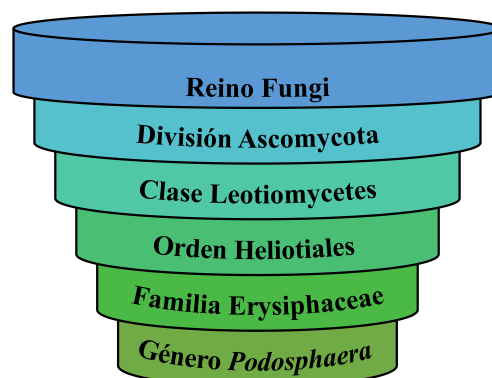


Figura 9 Taxonomía de *Podospaera macularis*.
Figura de elaboración propia.

La enfermedad por oídio, aunque de forma colectiva es muy común en una amplia variedad de plantas, las especies, de forma individual, suelen ser de una única especie vegetal (Weldon *et al.*, 2021). Durante un tiempo se consideró que *P. macularis* podía invernar en material vegetal próximo a la parcela, pero se ha demostrado que es específico del género *Humulus* (Salmon, 1907; Blodgett, 1913). Weldon *et al.* (2020) determinó que *P. macularis*, que afecta a *H. lupulus* también podía infectar a *Cannabis* spp. ambas de la misma familia Cannabaceae.

De la biología de este hongo se conocen la fase imperfecta o asexual y la fase perfecta o sexual. La reproducción durante la fase asexual consiste en la producción de conidios en cadena con forma elipsoidal o cilíndrica que se observan fácilmente en las muestras con sintomatología de polvo blanco sobre el material vegetal. En la fase sexual, la reproducción se lleva a cabo mediante la producción de chasmotecios que se pueden observar sobre el material infectado cuando se encuentran ya maduros con una coloración oscura. Son estructuras de resistencia que albergan en su interior las esporas sexuales o ascosporas que pueden permanecer en el suelo durante periodos de tiempo largos sin necesidad de estar ligado a material vivo (Weldon *et al.*, 2021).

Con condiciones óptimas de humedad y temperatura y cuando la planta comienza a estar activa, comienzan los primeros ciclos de infección por oídio. Si se han formado en la temporada anterior, con humedad óptima, los chasmotecios se engrosan hasta que expulsan las ascosporas y se depositan sobre la superficie de las hojas de *H. lupulus*. Si la reproducción es asexual, el hongo sobrevive el invierno en las yemas de los tallos enterrados de la planta y al crecer ésta, el hongo se expande con ella. Los conidios de oídio no pueden desplazarse largas distancias (2008). Según Periest (1962), el 90% de las ascosporas de *P. macularis* expulsados por los chasmotecios viajaron 1,5 m desde la planta hospedadora, las distancias más largas podrían recorrerse con ayuda del viento. Al entrar en contacto con la planta, las ascosporas o las conidias, según la fase reproductiva, emiten el tubo de germinación que se alarga y penetra en las hojas. Una vez dentro de una célula superficial, este tubo se engrosa y forma lo que se denomina haustorio, que es una estructura en forma de saco. Ésta se engrosa dentro de la célula cumpliendo dos funciones, por un lado, ejercer de ancla para sujetar al hongo a la superficie de la hoja y, por otro lado, absorber el

contenido celular. El tubo de germinación emite más ramificaciones o micelio que cubren la hoja tanto en superficie como en altura. Las hifas del micelio que crecen en altura comienzan a formar septos, dividiendo la hifa en segmentos rectangulares que entre todos ellos forman los conidióforos. Los segmentos exteriores van engrosando su pared y adquiriendo una forma más redondeada hasta que consiguen desprenderse. Estas estructuras son los conidios o esporas de la reproducción asexual. Una vez se desprenden, éstas pueden viajar, con ayuda del viento, a infectar nuevos tejidos vegetales y repetir el ciclo de infección (Blodgett, 1913). Es un microorganismo heterotálico por lo que para completar la fase sexual necesita estar en contacto con una pareja compatible. Cuando el micelio de dos individuos compatibles se superpone, cada uno de los individuos desarrolla estructuras de reproducción compatibles y se produce la fertilización (Weldon *et al.*, 2021). Una capa de micelio recubre el cuerpo formado en la reproducción sexual. Se forman dos capas de células, la interior se encarga de conformar las ascosporas y la exterior se engrosa para que, al finalizar la maduración, esta estructura, llamada chasmotecio, sea resistente al invierno (Blodgett, 1913). Las dos parejas complementarias descritas hasta el momento son MAT1-1 y MAT1-2. En Reino Unido y Europa del Este se han encontrado los dos *mating type*, mientras que en EE. UU. no se ha observado la fase perfecta del hongo (Weldon *et al.*, 2021).

La sintomatología de esta enfermedad cubre con un micelio blanco la superficie de la planta (Figura 10 Daños causados por *Podosphaera macularis* en (a) las hojas del lúpulo, (b) antes de que se forme la flor, (c y d) en los conos. (e) conos de lúpulo sanos y (f) conos de lúpulo infectados. Imágenes propias.). Prefiere colonizar hojas jóvenes, en las que la superficie está menos engrosada, por lo que los síntomas comienzan a verse primero en las zonas más bajas de la planta. En los puntos donde se ha desarrollado el micelio, conforme pasa el tiempo, éste deja unas manchas necrosadas (Blodgett, 1913; Lorenzana de la Varga and Romero Cuadrado, 2023). Si el hongo coloniza las hojas, podría tener un efecto en la tasa de fotosíntesis, pero la colonización foliar no tiene un impacto sobre la producción o rendimiento. No obstante, la infección de las hojas de forma severa puede ser un foco de inóculo para las infecciones siguientes sobre conos teniendo un impacto importante sobre la producción y calidad de la cosecha (Block *et al.*, 2021). La sintomatología que se observa en los conos colonizados puede variar en función de la presión de la enfermedad en la parcela y el momento de colonización. Si la infección es tardía, cuando el cono ya está formado, la infección puede ser solo superficial, observándose un micelio blanco sobre la superficie del cono sin que este pierda la forma o el color de las partes no afectadas. Por el contrario, si la infección es temprana, antes de que se forme la flor, el cono se desarrolla deformado y compacto y cambia su verde característico por un marrón (Lorenzana de la Varga and Romero Cuadrado, 2023). Al presentar esta sintomatología, los conos pierden todo su valor comercial (O'Neal *et al.*, 2015), pudiendo ser retirado el lote.

Hasta ahora, el control de esta enfermedad se ha llevado a cabo por medios químicos o culturales o usando material vegetal resistente. Dado que este cultivo se reproduce vegetativamente y en una parcela hay una uniformidad genética, una presión de enfermedad intensa hace que la resistencia de la variedad no sea un carácter duradero. Se conocen siete genes asociados a la resistencia al oídio del lúpulo, Rb, R1-R6. En EE. UU., se observó que los aislados de oídio que más se identificaban en las parcelas eran virulentos a las plantas con los genes de resistencia Rb, R3 y R5 (Block *et al.*, 2021). Por ello, se comenzaron a plantar variedades de lúpulo con genes de resistencia R6, lo que provocó la aparición de aislados virulentos sobre R6 denominados como V6.

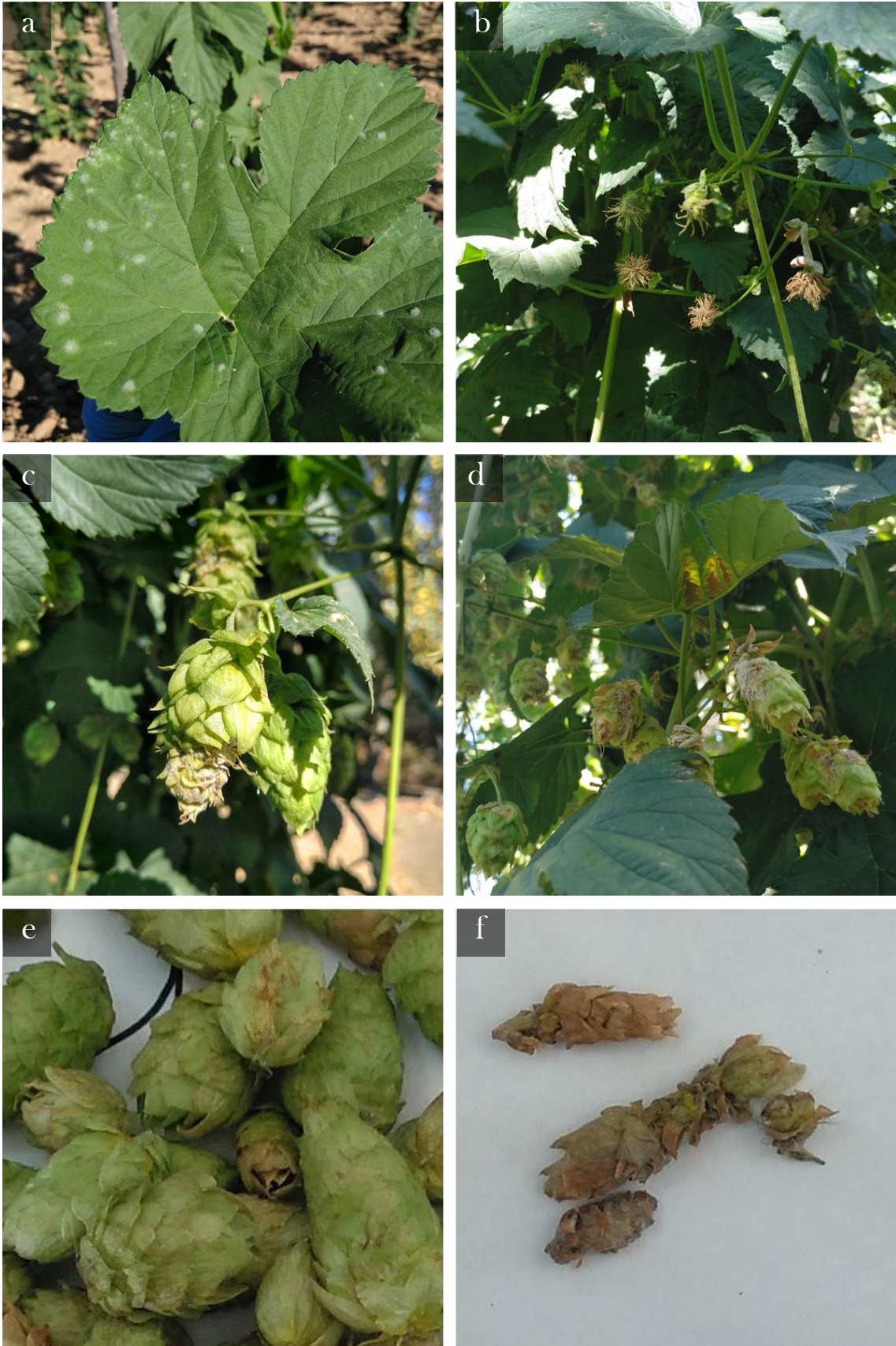


Figura 10 Daños causados por *Podosphaera macularis* en (a) las hojas del lúpulo, (b) antes de que se forme la flor, (c y d) en los conos. (e) conos de lúpulo sanos y (f) conos de lúpulo infectados. Imágenes propias.

La susceptibilidad al oídio varía en función del cultivar de lúpulo. Los aislados de *P. macularis* son capaces de infectar cultivares con uno o más genes de resistencia, pero todavía no se ha identificado un aislado que sea virulento para todos los genes de resistencia (Wolfenbarger *et al.*, 2016). El cultivar de Nugget tiene resistencia R6 frente a oídio. Se cree que ésta, asociada a R6, se debe más a la ausencia de un gen de susceptibilidad que a la presencia de un gen de resistencia (Henning *et al.*, 2011).

Otras formas de control de la enfermedad en las parcelas con incidencia de *P. macularis* se basan en el uso de prácticas culturales o en la aplicación de productos fitosanitarios. Dentro de las medidas culturales se recomienda reducir el follaje basal de las plantas una vez que éstas han alcanzado la mitad de su desarrollo en altura, controlar el riego y fertilización, o podar al comienzo de la temporada para reducir el inóculo de los primeros brotes (O´Neal *et al.*, 2015; Lorenzana de la Varga and Romero Cuadrado, 2023). Entre los productos fitosanitarios autorizados para la campaña de 2023 en España se incluyen las materias activas de azufre, aceite de naranja o *Bacillus amyloliquefaciens* (MAPA, 2023). En los últimos años, se han retirado los productos de síntesis química con acción sobre el hongo, por lo que es vital encontrar nuevas formas eficientes de controlar la enfermedad con medios no dañinos para el medio ambiente.

Agricultura sostenible

La agricultura sostenible es un sistema de producción que garantiza la satisfacción de las necesidades presentes y futuras y, al mismo tiempo, la rentabilidad, salud ambiental y equidad social (FAO, 2018). En la actualidad, hay diversos desafíos que afectan a la producción agrícola y ganadera. Por un lado, el aumento de la población mundial que se prevé en los próximos años, y, por otro, las consecuencias que el cambio climático puede tener en la alteración de los ecosistemas tal cual se conocen ahora. En 1992, en la Cumbre para la Tierra de las Naciones Unidas, se hacía mención a la gestión sostenible de la Tierra, que se define como “el uso de los recursos de la Tierra, incluyendo suelos, agua, animales y plantas, para la producción de bienes para cubrir las necesidades humanas que cambian, mientras, simultáneamente, se asegura el potencial productivo a largo plazo de estos recursos y el mantenimiento de sus funciones medioambientales” (ONU, 1992; FAO, 2023). En términos generales, entre los cinco principios fundamentales de sostenibilidad para la alimentación y la agricultura, la FAO defiende aumentar la productividad en los sistemas de alimentación y proteger e impulsar los recursos naturales (FAO, 2018).

La agricultura, actualmente se enfrenta a dos retos. Por una parte, debido al aumento de la población mundial hay más demanda de alimentos, pero la situación de los terrenos se está degradando por un uso inapropiado como el monocultivo o el uso excesivo de productos fitosanitarios. Esa degradación de los suelos está ligada a una menor disponibilidad de nutrientes para las plantas. Por otra parte, la planta puede verse sometida a otros tipos de estrés como bióticos y/o abióticos. En el caso del estrés biótico, debido a un desequilibrio del suelo, en muchas ocasiones causada por la propia acción de la agricultura se fomenta el desarrollo de microorganismos fitopatógenos que influyen en los cultivos. Hasta ahora, la forma de controlar ese desequilibrio ha sido la aplicación de productos fitosanitarios, pero esta solución aun siendo efectiva y el método convencional, supone un problema medioambiental, su uso habitual contribuye a la contaminación del suelo, agua y aire, incluso afecta a la biodiversidad del ecosistema. En el caso del estrés abiótico, cada

vez más con el cambio climático, los cultivos se enfrentan a situaciones distintas a las que están habituados, como situaciones de calor o frío extremos, sequía, y otras situaciones como salinidad o contaminación de suelos por metales pesados. Para enfrentarse a esos cambios, hasta ahora, se ha aplicado la biotecnología para desarrollar variedades con capacidad de resistencia a distintas situaciones de estrés abiótico. Este enfoque tiene muchas ventajas, pero también el inconveniente del tiempo que requiere hasta obtener productos finales con buenos resultados. Estos retos hacen que en la agricultura se busque un enfoque más sostenible que, en la medida de lo posible, consiga superar los retos a los que se enfrenta sin influir negativamente sobre los recursos naturales de la Tierra.

Uno de los desafíos que se han descrito es el control de estrés biótico de un cultivo, causado por un desequilibrio en la biodiversidad de un ecosistema. El control de plagas y enfermedades en la agricultura requiere de innovación pues, hasta el momento, la solución más utilizada ha sido el uso de productos fitosanitarios de síntesis química, con las consecuencias ambientales que conlleva. Para el manejo de plagas y enfermedades de los cultivos, desde la Política Agraria Común (PAC) se apuesta por una producción integrada en la que se reduce el número de productos de síntesis química autorizados en agricultura y, en compensación, se da prioridad al uso de métodos no químicos descritos en la producción integrada, como el uso de agentes de control biológico. Con estas medidas que impulsa la agricultura sostenible se buscan soluciones y alternativas al control de plagas y enfermedades menos agresivas con el medio ambiente. La lucha biológica contra plagas y enfermedades es una forma de utilizar los recursos naturales para enfrentarse a un desequilibrio en un ecosistema en un momento puntual.

Control biológico

El control biológico es una forma de reducir la incidencia de plagas, enfermedades o vegetación adventicia que puede afectar a un cultivo, introduciendo enemigos naturales vivos, capaces de limitar la expansión del agente patógeno y reequilibrar el ecosistema del cultivo.

Un agente de control biológico (en inglés biocontrol agent, BCA) es un organismo vivo distinto al hombre que es capaz de controlar el desarrollo de otros organismos. Los BCA pueden ser artrópodos, hongos, bacterias, virus o nemátodos. Hay numerosos trabajos publicados en los que se comprueba la efectividad del uso de BCA para el control biológico de plagas o enfermedades. Para el control biológico de plagas es más habitual el uso de artrópodos y nemátodos. Las larvas de mariquita (*Coccinella septempunctata*) son un depredador conocido contra pulgones (Singh *et al.*, 2004). Algunos ácaros de la familia de los fitoseidos se suelen usar para el control de araña roja (*Tetranychus urticae*) (Escudero and Ferragut, 2005). Los nemátodos entomopatógenos de los géneros *Steinernema* spp. y *Heterorhabditis* spp. se utilizan para el control de distintos insectos como el picudo rojo de las palmeras *Rhynchophorus ferrugineus* (García del Pino and Morton, 2015). Los hongos y bacterias beneficiosos pueden emplearse en el control tanto de plagas como enfermedades y en algunos casos para controlar vegetación adventicia. La bacteria *Bacillus thuringiensis* se utiliza en el control de insectos con su capacidad de producir proteínas cry, con carácter insecticida contra *Acanthoscelides obtectus* y *Xylotrechus arvicola*, entre otros insectos (Rodríguez-González *et al.*, 2020, 2022). Otras especies de *Bacillus* se pueden emplear para el control de enfermedades fúngicas (Fira *et al.*, 2018). El hongo *Beauveria bassiana* se ha empleado de forma efectiva contra insectos (Rodríguez-González *et al.*, 2017;

A. Rodríguez-González *et al.*, 2018). *Trichoderma* spp. contra hongos como *Rhizoctonia solani* en alubia (Mayo *et al.*, 2015, 2016), hongos de madera de vid, como *Phaeoacremonium minimum* (Carro-Huerga *et al.*, 2020) o contra insectos como *A. obtectus* y *X. arvicola* (Rodríguez-González *et al.*, 2017; A. Rodríguez-González *et al.*, 2018).

Tabla 1 Productos a base de agentes de control biológico (BCA) autorizados en el Registro de productos fitosanitarios (MAPA, 2023) según su acción.

Acción	Organismo	Nombre
Acaricida	Hongo	<i>Metarhizium brunneum</i>
Bactericida	Hongo	<i>Aureobasidium pullulans</i>
		<i>Candida oleophila</i>
Fungicida	Bacteria	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
		<i>Bacillus pumilus</i>
		<i>Bacillus subtilis</i>
	Hongo	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>
		<i>Ampelomyces quisqualis</i>
		<i>Aureobasidium pullulans</i>
		<i>Candida oleophila</i>
		<i>Gliocladium catenulatum</i>
		<i>Pythium oligandrum</i>
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
		<i>Trichoderma asperellum</i> (antes <i>T. harzianum</i>) cepa T25
		<i>Trichoderma atroviride</i> (antes <i>T. harzianum</i>) cepa T11
		<i>Trichoderma gamsii</i>
		<i>Trichoderma harzianum rifai</i>
		Insecticida
<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>		
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>		
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>		
Hongo	<i>Beauveria bassiana</i>	
	<i>Isaria fumosorosea</i>	
	<i>Lecanicillium muscarium</i>	
	<i>Metarhizium brunneum</i>	
Virus	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	
	Granulovirus de <i>Cydia pomonella</i>	
	Virus de la poliedrosis nuclear de <i>Helicoverpa armigera</i>	
	Virus granulosis de la <i>Carpocapsa</i>	
Nematicida	Bacteria	<i>Bacillus firmus</i>
	Hongo	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
Inductor de mecanismos de defensa	Virus	Virus atenuado del mosaico del pepino
		Virus del mosaico del pepino

Actualmente en el mercado se encuentran distintos productos comerciales preparados a base de BCA, en la Tabla 1 se muestra la lista de BCA autorizados en el registro de productos fitosanitarios (MAPA, 2023) clasificados según su uso. Para que una aplicación de BCA tenga buenos resultados, es importante conocer la biología y los mecanismos de acción del microorganismo que se estudia. Que el BCA funcione depende en gran medida de las condiciones ambientales en las que se introduce.

Bacillus amyloliquefaciens (ex Fukomoto) Priest et al. es una bacteria gram-positiva y aeróbica del suelo que forma endosporas. Está autorizada como fungicida e insecticida en el registro de productos fitosanitarios (MAPA, 2023). Es capaz de colonizar la rizosfera y crece bajo situaciones de estrés, cualidades que hacen que sea un buen BCA. Diversos estudios han identificado en esta especie, capacidades de control biológico como la promoción de crecimiento y el control de fitopatógenos, además de mejorar la adaptación de la planta a distintas situaciones de estrés abiótico (Luo *et al.*, 2022). Tiene la capacidad de formar biopelículas y reducir la presencia de fitopatógenos, aunque se considera que el mecanismo de acción principal es la inducción de resistencia sistémica en las plantas (Chowdhury *et al.*, 2015). Actualmente *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* está permitido como uso menor autorizado por procedimiento nacional para el control de *P. macularis* y *Botrytis* spp. en lúpulo (MAPA, 2023). En el capítulo 1 se evalúa su capacidad de biocontrol en campo en comparación con otros métodos de control.

Trichoderma spp.

El género *Trichoderma* Persoon es un grupo de hongos cosmopolitas que se encuentran en suelos agrícolas y sobre algunos sustratos vegetales. Son hongos filamentosos de color claro y de crecimiento rápido que se reproduce asexualmente. A algunas especies se asocia un teleomorfo del género *Hypocrea*, pero en muchas especies con interés como BCA no se conoce estado sexual (Harman *et al.*, 2004). Su taxonomía se esquematiza en la Figura 11.

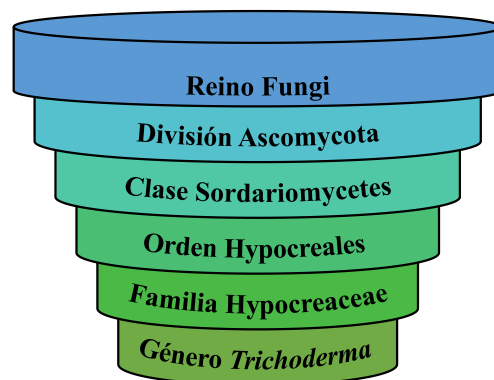


Figura 11 Taxonomía del género *Trichoderma*. Figura de elaboración propia.

Las características específicas varían según la especie, pero a rasgos generales, son hongos filamentosos donde las hifas suelen ser alargadas, con septos y ramificadas de color transparente o claro con un diámetro en torno a 2-4 μm . Son hongos de desarrollo rápido, aspecto importante para el éxito de este hongo frente a otros. En el extremo de la hifa se pueden formar conidióforos, las estructuras de reproducción asexual de *Trichoderma*. En estas estructuras se forman los conidios, las esporas de reproducción asexual del hongo, que suelen presentar una coloración verde claro o verde oliva con unas dimensiones aproximadas de entre 2-3 μm de diámetro. Los conidios juegan un papel importante a la hora de la preparación de este hongo en formulados de control biológico, donde habitualmente se hacen disoluciones de esas esporas.

Trichoderma generalmente se describe como un hongo endófito, de rápido crecimiento, oportunista y simbiote para las plantas (Harman *et al.*, 2004; Saba *et al.*, 2012). El género incluye a muchas especies con gran importancia agronómica. Hasta hace un tiempo, su importancia radicaba en la competencia directa hacia algunos fitopatógenos

como los de los géneros *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Sclerotinia*, y *Alternaria* (Alabouvette *et al.*, 1998; Mayo *et al.*, 2015; Álvarez-García *et al.*, 2020; Ji, Liu, *et al.*, 2021). Pero sus beneficios agronómicos incluyen más métodos de acción, como promoción de crecimiento de plantas (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Chowdappa *et al.*, 2013; Martínez-Medina *et al.*, 2014; Mayo *et al.*, 2015, 2016; Kakabouki *et al.*, 2021), producción de sustancias antibióticas (Vinale *et al.*, 2012), inducción de resistencias (Shoresh *et al.*, 2010) y mejora de absorción de nutrientes (Sivan and Chet, 1993; Howell, 2003; Benítez *et al.*, 2004; Pandya *et al.*, 2011). A continuación, se describen los mecanismos de acción descritos para *Trichoderma* que hacen de este microorganismo un agente de beneficio para la agricultura.

Trichoderma spp. presenta diversos mecanismos de acción que pueden suponer un beneficio agrícola con la interacción entre otros microorganismos o artrópodos o con las plantas, fomentando el equilibrio del ecosistema agrícola en el que se encuentra.

Competencia por nutrientes y espacio con otros microorganismos. Es un hongo capaz de competir con otros microorganismos del suelo por los nutrientes y espacio, lo que puede impedir el crecimiento y desarrollo de otros hongos fitopatógenos (Howell, 2003; Harman *et al.*, 2004). *Trichoderma* spp. ha demostrado ser un hongo de rápido desarrollo facilitado por el exudado del sistema radicular de las plantas (Hermosa *et al.*, 2012; Poveda *et al.*, 2020).

Micoparasitismo El micoparasitismo es un conjunto de actividades complejo que lleva a la muerte y utilización de nutrientes del hongo patógeno (Lumsden, 1992). *Trichoderma* es capaz de detectar el hongo sin estar en contacto con él. Una vez lo detecta comienza su desarrollo en su dirección y desencadena la síntesis de enzimas que degradan la pared celular del hongo, formada principalmente por β -1,3-glucano y quitina. Una vez entran en contacto, *Trichoderma* se adhiere a las hifas del hongo formando apresoria y produciendo enzimas, β -1,3-glucanasas entre otras, que degradan la pared celular de los hongos fitopatógenos próximos (Sivan and Chet, 1989; Menéndez, 1996). Para algunas especies de *Trichoderma* el micoparasitismo es su principal mecanismo de acción (Papavizas, 1985; Chet, 1987; Howell, 2003; Elamathi *et al.*, 2018).

Antibiosis. La producción de sustancias de bajo peso molecular y metabolitos con actividad antimicrobiana es otro de los mecanismos de acción más estudiados de *Trichoderma* spp. Estas sustancias antibióticas son capaces de inhibir el desarrollo del patógeno y, en algunos casos, impiden que éste colonice la planta hospedadora. Algunos de estos productos son pironas como el 6 pentyl-a-pyrone (6PP), isonitrilos, sesquiterpenos, viridina, gliotoxinas o ácido harziánico (Howell, 1998; Benítez *et al.*, 2004; Mukherjee *et al.*, 2012), responsables del control sobre distintos aislamientos fúngicos (Scarselletti and Faull, 1994; Vinale *et al.*, 2008), aunque la eficacia de estos compuestos no es similar ante todos los fitopatógenos. En algunos casos los mecanismos de acción de micoparasitismo y antibiosis en combinación resultan en mejores resultados de biocontrol (Howell, 1998; Asad, 2022).

Inducción de resistencia sistémica o localizada. Otro de los mecanismos de acción es la inducción de resistencia en la planta después de tratarla con el BCA. La resistencia inducida o sistémica ocurre en muchas plantas en respuesta a un estrés biótico. En muchos casos se producen compuestos que actúan como señales que activan o participan en rutas bioquímicas fundamentales para los mecanismos de defensa de la planta (Mayo *et al.*, 2015, 2016; Mayo-Prieto *et al.*, 2019). Sustancias como el ácido jasmónico, el ácido salicílico o el etileno son ejemplos de esas sustancias elicitoras (Shoresh *et al.*, 2005). La respuesta sistémica se caracteriza porque el BCA con esta capacidad se encuentra en otra localización

distinta a donde suceden los daños. *Trichoderma* puede producir estas sustancias antes de que la planta lo haga y, por tanto, activar las rutas bioquímicas en las que participan activando genes de defensa de la planta como proteínas PR o fitoalexinas (Mayo *et al.*, 2016). Según el tipo de patógeno, la planta puede responder mejor con un elicitor u otro. Ejemplos de la inducción de resistencia fue descrito por De Meyer *et al.* (1998) que observaron que tratando el suelo con *Trichoderma* reducía los daños causados por *B. cinerea* en la parte aérea de distintos cultivos. La competencia de *Trichoderma* sp. con *B. cinerea* es más efectiva que el uso de componentes químicos dada la alta variabilidad genética del patógeno, que puede desarrollar cepas resistentes con más facilidad (Latorre *et al.*, 2001).

Bioestimulante. *Trichoderma* puede beneficiar el desarrollo de las plantas con las que interacciona. Puede promover el desarrollo de las raíces, aumentar la absorción de nutrientes (Saba *et al.*, 2012), favorecer la producción de fitohormonas o reguladores del crecimiento (en inglés plant growth regulators PGR) además de mejorar la resistencia a estrés abiótico (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Hoyos-Carvajal *et al.*, 2009; Chowdappa *et al.*, 2013; Martínez-Medina *et al.*, 2014). Algunos aislados de *Trichoderma* producen sideróforos, moléculas sintetizadas para captar iones de hierro del suelo, inmovilizándolo y disminuyendo su disponibilidad para los hongos fitopatógenos (Chet and Inbar, 1994), lo que favorece su captación por la planta (Vinale *et al.*, 2013). El incremento de la biomasa de una planta se ha asociado con la síntesis de compuestos derivados de las auxinas como el ácido indole-3-acético (IAA) u otros PGR como el ácido giberélico (GA₃) (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Garnica-Vergara *et al.*, 2016; Nieto-Jacobo *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2019; Bader *et al.*, 2020).

En conclusión, los mecanismos de acción de *Trichoderma* son variados y complejos y pueden variar en función de la planta hospedadora, el patógeno diana o las condiciones ambientales en las que se encuentra (Howell, 2003). La eficacia de *Trichoderma* como BCA puede deberse al uso de varios mecanismos de acción sinérgicos (Howell, 2003; Benítez *et al.*, 2004). En el capítulo 2 se evalúan distintos mecanismos de acción de algunos aislados de *Trichoderma* para identificar su posible uso como BCA en lúpulo.

Bioeconomía circular

Según la estrategia española de bioeconomía dentro del horizonte 2030 (Mineco, 2015), la bioeconomía es el conjunto de las actividades económicas que obtienen productos y servicios, generando valor económico, utilizando, como elementos fundamentales, los recursos de origen biológico, de manera eficiente y sostenible. La bioeconomía circular incluye además el concepto de reutilización o reciclaje de productos existentes para otorgarle un valor añadido.

Como se ha visto anteriormente, más del 90% de la producción de lúpulo se destina a la industria cervecera, en la cual el único producto de valor comercial son los conos de lúpulo. De esa producción se desechan las trepas, hojas y brácteas y bractéolas desprendidas de los conos. La proporción de desechos que se generan es muy alta respecto a la producción de conos, ya que, en una planta de 5 kg, el 30% corresponde al peso fresco de los conos y cerca del 70% son desechos sin aprovechamiento para la industria cervecera. Desde el punto de vista de la bioeconomía circular, ese 70% de restos vegetales son recursos de origen biológico de los que se pueden obtener productos con valor añadido. Algunos

grupos de investigación y colectivos buscan encontrar aplicaciones diversas a esos recursos biológicos rechazados por la industria. A continuación, se citan algunos de ellos.

La aplicación inmediata podría pensarse en el compostaje, que es una de las formas más eficientes de reciclar residuos orgánicos (Pergola 2018). Las hojas, brácteas y bractéolas que se desligan de la trepa se pueden utilizar para la realización de compost y re-empLEARlo en la fertilización de campos de cultivo. Otra de las aplicaciones posibles puede ser la obtención de fibras para la producción de tejidos o envases biodegradables. Y, por último, se puede usar como fuente de carbono para el desarrollo de microorganismos beneficiosos para la agricultura. En los próximos párrafos se habla de los avances y actualidad de cada una de estas aplicaciones.

El compostaje, como se veía en el párrafo anterior, es el ejemplo más eficiente de bioeconomía circular para restos de cosecha. Es un proceso controlado de degradación aerobia del material vegetal que lo descompone en materia orgánica estable para su asimilación por las plantas. Una vez elaborado el compost se puede utilizar para fertilizar los cultivos. Uno de los inconvenientes que presenta el lúpulo es la cuerda que se utiliza de guía, en muchos casos se utiliza de polipropileno o alambre. El proyecto BioTHOP (BioTHOP, 2019) tiene como uno de sus objetivos el reemplazo de las guías de polipropileno por guías biodegradables. Existen actualmente en el mercado cuerdas biodegradables de materiales como sisal, fibra de coco o ácido poliláctico (Čeh *et al.*, 2023) que sustituyen a las de plástico para cumplir la finalidad de guía del lúpulo.

Luskar *et al.* (2022) obtuvieron un compost de restos de cosecha del lúpulo con más de un 2% de nitrógeno, sin efectos de fitotoxicidad sobre la germinación y desarrollo de plántulas. Para aquellos casos en los que no se utilizan guías biodegradables se recomienda triturar las trepas con más de 30 cm para poder quitar con facilidad el plástico posteriormente (Čeh *et al.*, 2023). Afonso *et al.* (2021) observaron que las hojas de lúpulo compostadas con estiércol de vaca en una proporción 1:1 o con paja en proporciones superiores a 2:1 podían ser una buena solución para la utilización de residuos agrícolas sin fitotoxicidad para cultivos hortícolas como la lechuga.

El biogás es un combustible a base de metano y dióxido de carbono, obtenido a partir de productos orgánicos por medio de una degradación anaerobia. Para la producción de biogás se pueden utilizar restos de cosecha como las trepas de lúpulo. El uso de éstas en la producción de metano es en torno a un 50% menos eficiente que el uso de maíz (Hagemann *et al.*, 2021) pero es una forma de dar utilidad a la cantidad de desechos que se generan tras la cosecha. Gebhardt *et al.* (2022) resaltan una tercera reutilización de las trepas de lúpulo después de ser procesadas en la planta de biomasa, dado su alto contenido en fibra, el subproducto generado se puede emplear en la producción de materiales compuestos con una matriz de plástico para utilizar en interiores de automóviles.

Las empresas Zelfo Technology (Zelfo Technology GmbH, Brandenburgo, Alemania) y TRIDAS (TRIDAS Technology s.r.o., Valašské Meziříčí, República Checa) han desarrollado una tecnología para utilizar los desechos de cosecha del lúpulo y transformarlos en pulpa para ser moldeada en envases protectores biodegradables. Las empresas Tecnopackaging (Tecnopackaging, Zaragoza, España) y TECOS (TECOS, Celje, Eslovenia) han desarrollado otra aplicación con las fibras de lúpulo. Las fibras de lúpulo junto con ácido poliláctico sirven como elementos que conforman un material compuesto

resistente apto para fabricar envases biodegradables como macetas o bandejas de uso alimentario.

Además de las aplicaciones como fertilizante o fibra, los residuos de la cosecha del lúpulo pueden servir para favorecer el desarrollo de microorganismos beneficiosos. Al igual que para realizar el compost, el contenido en carbono es importante, pues los microorganismos requieren de este elemento como componente y su fuente principal de energía (Danielson and Davey, 1973; Afonso *et al.*, 2021). Para el desarrollo de *Trichoderma*, hongo usado en control biológico, es importante garantizar una fuente de carbono, para que pueda desempeñar sus funciones de protección frente a la semilla y posteriormente a la planta. En horticultura y agricultura es una práctica habitual el recubrimiento de semillas con distintos fines como mejorar las condiciones de siembra, combatir plagas o enfermedades, mejorar su resistencia a estrés abiótico o facilitar su manejo. En la actualidad existen recubrimientos de semillas con agentes de control biológico, pero la actividad de estos microorganismos depende de la cantidad de carbono y materia orgánica que presente el suelo. En el capítulo 3 se describe la patente concedida por la que se ofrece una alternativa sostenible para la reutilización y revalorización de desechos de la cosecha de lúpulo. La alternativa consiste en un sustrato a base de los restos de conos, brácteas y bractéolas no aprovechables por la industria cervecera, empleado para recubrir semillas y, de este modo, fomentar el desarrollo del agente de biocontrol inoculado y la germinación y biomasa de las plántulas.

Referencias

Afonso, S., Arrobas, M., Pereira, E. L. y Rodrigues, M. Â. (2021) "Recycling nutrient-rich hop leaves by composting with wheat straw and farmyard manure in suitable mixtures", *Journal of environmental management*. Academic Press, 284. doi:10.1016/j.jenvman.2021.112105.

Alabouvette, C., Schippers, B., Lemanceau, P. y Bakker, P. A. H. M. (1998) "Biological control of *Fusarium* wilts. Towards development of commercial products", en Bolland, G. J. y Kuykendall, L. D. (eds.) *Plant-microbe interactions and biological control*. M. Dekker, pp. 15-36.

Almaguer, C., Schönberger, C., Gastl, M., Arendt, E. K. y Becker, T. (2014) "*Humulus lupulus* - a story that begs to be told. A review", *Journal of the institute of brewing*. John Wiley and Sons Inc., 120(4), pp. 289-314. doi:10.1002/jib.160.

Álvarez-García, S., Mayo-Prieto, S., Gutiérrez, S. y Casquero, P. A. (2020) "Self-inhibitory activity of *Trichoderma* soluble metabolites and their antifungal effects on *Fusarium oxysporum*", *Journal of fungi*, 6(3), p. 176. doi:10.3390/jof6030176.

Asad, S. A. (2022) "Mechanisms of action and biocontrol potential of *Trichoderma* against fungal plant diseases - A review", *Ecological complexity*. Elsevier, 49, p. 100978. doi:10.1016/J.ECOCOM.2021.100978.

Bacon, C. W., Porter, J. K., Norred, W. P. y Leslie, J. F. (1996) "Production of fusaric acid by *Fusarium* species", *Applied and environmental microbiology*. American Society for Microbiology, 62(11), pp. 4039-4043. doi:10.1128/aem.62.11.4039-4043.1996.

Bader, A. N., Salerno, G. L., Covacevich, F. y Consolo, V. F. (2020) "Native *Trichoderma harzianum* strains from Argentina produce indole-3 acetic acid and phosphorus solubilization, promote growth and control wilt disease on tomato (*Solanum lycopersicum* L.)", *Journal of King Saud University - Science*. Elsevier B.V., 32(1), pp. 867-873. doi:10.1016/j.jksus.2019.04.002.

Barth Haas (2022) *Barth Haas Report 2021/2022*. Disponible en: <https://www.barthhaas.com/resources/barthhaas-report> (Accedido: 19 de mayo de 2023).

Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C. y Codón, A. C. (2004) "Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains", *International microbiology*, 7(4), pp. 249-260. doi:1139-6709.

Berhanu, A. (2014) "Microbial profile of tella and the role of gesho (*Rhamnus prinnoides*) as bittering and antimicrobial agent in traditional tella (beer) production", *International food research journal*, 21(1), pp. 357-365.

Bienapfl, J. C., Ocamb, C. M., Klein, R. y Nelson, M. (2005) "*Fusarium* cone tip blight of *Humulus lupulus*", *Acta Horticulturae*, 668, pp. 123-128. doi:10.17660/ActaHortic.2005.668.16.

Biendl (2009) "Hops and Health", *Master brewers association of the americans - Technical quarterly*. Scientific Societies, 46. doi:10.1094/TQ-46-2-0416-01.

BioTHOP (2019) *About the project*. Disponible en: <https://www.life-biothop.eu/project/about-the-project/> (Accedido: 4 de mayo de 2023).

Błaszczuk, L., Basińska-Barczak, A., Ćwiek-Kupczyńska, H., Gromadzka, K., Popiel, D. y Stępień, Ł. (2017) "Suppressive effect of *Trichoderma* spp. on toxigenic *Fusarium* species", *Polish journal of microbiology*. Polish Society of Microbiologists, 66(1), pp. 85-100. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29359702/> (Accedido: 15 de abril de 2021).

Blaya, J., López-Mondéjar, R., Lloret, E., Pascual, J. A. y Ros, M. (2013) "Changes induced by *Trichoderma harzianum* in suppressive compost controlling *Fusarium* wilt", *Pesticide biochemistry and physiology*. Elsevier Inc., 107(1), pp. 112-119. doi:10.1016/j.pestbp.2013.06.001.

Block, M., Knaus, B. J., Wiseman, M. S., Grünwald, N. J. y Gent, D. H. (2021) "Development of a diagnostic assay for race differentiation of *Podosphaera macularis*", *Plant disease*, 105(4), pp. 965-971. doi:10.1094/PDIS-06-20-1289-RE.

Blodgett, B. F. M. (1913) *Hop mildew*. Bulletin 328. Ithaca, Nueva York: Cornell University. Agricultural experiment station of the college of agriculture.

Bock, K. R. (1966) "Arabis mosaic and Prunus necrotic ringspot viruses in hop (*Humulus lupulus* L.)", *Annals of applied biology*, 57, pp. 131-140.

Carro-Huerga, G., Compant, S., Gorfer, M., Cardoza, R. E., Schmoll, M., Gutiérrez, S. y Casquero, P. A. (2020) "Colonization of *Vitis vinifera* L. by the endophyte *Trichoderma* sp. strain T154: biocontrol activity against *Phaeoacremonium minimum*", *Frontiers in plant science*. Frontiers Media S.A., 11, pp. 1-15. doi:10.3389/fpls.2020.01170.

Catalán, P. (2006) "*Humulus* L.", en Castroviejo, S., Aedo, C., Laínz, M., Muñoz Garmendia, F., Nieto Feliner, G., Paiva, J., y Benedí, C. (eds.) *Flora ibérica*. Madrid: Real jardín botánico, CSIC, pp. 257-259. Disponible en: <http://www.floraiberica.org/> (Accedido: 19 de mayo de 2023).

Čeh, B., Luskar, L., Polanšek, J., Klančnik, A. K., Trošt, Ž., Čeh, B., Luskar, L., Polanšek, J., Klančnik, A. K. y Trošt, Ž. (2023) "Increasing the value of waste hop biomass by composting: closing the nutrient cycle on hop farms", en Rehman Hakeem, K. (ed.) *Organic fertilizers*. IntechOpen. doi:10.5772/INTECHOPEN.1001340.

Čermák, P., Palečková, V., Houška, M., Strohalm, J., Novotná, P., Mikyška, A., Jurková, M. y Sikorová, M. (2015) "Inhibitory effects of fresh hops on *Helicobacter pylori* strains", *Czech journal of food sciences*. Institute of Agricultural and Food Information, 33(4), pp. 302-307. doi:10.17221/261/2014-CJFS.

Chet, I. y Inbar, J. (1994) "Biological control of fungal pathogens", *Applied biochemistry and biotechnology*, 48, pp. 37-43.

Chet, I. (1987) "*Trichoderma*: application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi", en Chet, I. y Soper, J. W. & (eds.) *Innovative approaches to plant disease control*. Nueva York, pp. 137-160. doi:10.1086/416163.

Chowdappa, P., Mohan Kumar, S. P., Jyothi Lakshmi, M. y Upreti, K. K. (2013) "Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3", *Biological control*. Elsevier Inc., 65(1), pp. 109-117. doi:10.1016/j.biocontrol.2012.11.009.

Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Gao, X. W. y Borriss, R. (2015) "Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - A review", *Frontiers in microbiology*. Frontiers Research Foundation, 6(7), p. 780. doi:10.3389/FMICB.2015.00780/BIBTEX.

Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C. y López-Bucio, J. (2009) "*Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*", *Plant physiology*, 149(3), pp. 1579-1592. doi:10.1104/pp.108.130369.

Cornell, M. (2010) *Amber, gold and black: the history of Britain's great beers*. The history press.

Danielson, R. M. y Davey, C. B. (1973) "Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma*", *Soil biology and biochemistry*, 5, pp. 505-515.

Delyser, D. Y. y Kasper, W. J. (1994) "Hopped beer: The case for cultivation", *Economic botany*. Springer-Verlag, 48(2), pp. 166-170. doi:10.1007/BF02908210.

Diario Oficial de la Unión Europea (2006) "Reglamento 1850/2006 de la Comisión", 2004(13), pp. 72-87.

Donner, P., Pokorný, J., Jezek, J., Krofta, K., Patzak, J. y Pulkrábek, J. (2020) "Influence of weather conditions, irrigation and plant age on yield and alpha-acids content of Czech hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars", *Plant, soil and environment*, 66(1), pp. 41-46. doi:10.17221/627/2019-PSE.

Elamathi, E., Malathi, P., Viswanathan, R. y Ramesh Sundar, A. (2018) "Expression analysis on mycoparasitism related genes during antagonism of *Trichoderma* with *Colletotrichum falcatum* causing red rot in sugarcane", *Journal of plant biochemistry and biotechnology*. Springer, 27(3), pp. 351-361. doi:10.1007/s13562-018-0444-z.

Enz, M., Dachler, Ch. y Novartis (1998) *Compendio para la identificación de los estadios fenológicos de especies mono- y dicotiledóneas cultivadas escala BBCH extendida*.

Escudero, L. A. y Ferragut, F. (2005) "Life-history of predatory mites *Neoseiulus californicus* and *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae) on four spider mite species as prey, with special reference to *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae)", *Biological control*. Academic Press Inc., 32(3), pp. 378-384. doi:10.1016/j.biocontrol.2004.12.010.

FAO (2018) *Transformar la alimentación y la agricultura para alcanzar los ODS. 20 acciones interconectadas para guiar a los encargados de adoptar decisiones*. Roma.

FAO (2021) *FAOstat*. Disponible en: <https://www.fao.org/faostat/es/#home> (Accedido: 14 de mayo de 2023).

FAO (2023) *Marcos y enfoques - Alimentación y agricultura sostenibles*. Disponible en: <https://www.fao.org/sustainability/frameworks-approaches/es/> (Accedido: 16 de mayo de 2023).

Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J. y Stanković, S. (2018) "Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species", *Journal of biotechnology*. Elsevier B.V., 285, pp. 44-55. doi:10.1016/J.JBIOTECH.2018.07.044.

Forsyth, L. M., Smith, L. J. y Aitken, E. A. B. (2006) "Identification and characterization of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* capable of increasing and decreasing *Fusarium* wilt severity", *Mycological research*, 110(8), pp. 929-935. doi:10.1016/j.mycres.2006.03.008.

García del Pino, F. y Morton, A. (2015) "Orchard applications of entomopathogenic nematodes in Spain", en *Nematode pathogenesis of insects and other pests: ecology and applied technologies for sustainable plant and crop protection*. Springer international publishing, pp. 403-419. doi:10.1007/978-3-319-18266-7_16.

Garnica-Vergara, A., Barrera-Ortiz, S., Muñoz-Parra, E., Raya-González, J., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L., Ruiz-Herrera, L. F. y López-Bucio, J. (2016) "The volatile 6-pentyl-2 H -pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and *ETHYLENE INSENSITIVE 2* functioning", *New phytologist*. Blackwell Publishing Ltd, 209(4), pp. 1496-1512. doi:10.1111/nph.13725.

Gebhardt, M., Wanek, N., Lemmer, A. y Gresser, G. theodor (2022) "Comparison of fibers from hop rich biogas digestate with natural fibers as raw material for composites", *Journal of natural fibers*. Taylor and Francis Ltd., 19(17), pp. 16029-16039. doi:10.1080/15440478.2021.1958426.

Glawe, D. A. (2008) "The powdery mildews: A review of the world's most familiar (yet poorly known) plant pathogens", *Annual review of phytopathology*, pp. 27-51. doi:10.1146/annurev.phyto.46.081407.104740.

Gryndler, M., Krofta, K., Gryndlerová, H., Soukupová, L., Hřelová, H. y Gabriel, J. (2008) "Potentially dangerous fusarioid microorganisms associated with rot of hops (*Humulus lupulus* L.) plants in field culture", *Plant, soil and environment*, 54(4), pp. 149-154. doi:10.17221/387-PSE.

Hagemann, M. H., Born, U., Sprich, E., Seigner, L., Oechsner, H., Hülsemann, B., Steinbrenner, J., Winterhagen, P. y Lehmail, E. (2021) "Degradation of hop latent viroid during anaerobic digestion of infected hop harvest residues", *European journal of plant pathology*. Springer Science and Business Media B.V., 161(3), pp. 579-591. doi:10.1007/S10658-021-02344-2.

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. y Lorito, M. (2004) "*Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts", *Nature reviews microbiology*, 2(1), pp. 43-56. doi:10.1038/nrmicro797.

Henning, J. A., Townsend, M. S., Gent, D. H., Bassil, N., Matthews, P., Buck, E. y Beatson, R. (2011) "QTL mapping of powdery mildew susceptibility in hop (*Humulus lupulus* L.)", *Euphytica*. Springer, 180(3), pp. 411-420. doi:10.1007/s10681-011-0403-4.

Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. y Monte, E. (2012) "Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes", *Microbiology*, pp. 17-25. doi:10.1099/mic.0.052274-0.

Howell, C. R. (1998) "The role of antibiosis in biocontrol", en Harman, G. E. y Kubicek, C. P. (eds.) *Trichoderma and Gliocladium. Enzymes, biological control and commercial applications*. Taylor & Francis.

Howell, C. R. (2003) "Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts.", *Plant Disease*, 87(1), pp. 4-10.

Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S. y Bissett, J. (2009) "Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*", *Biological control*. Academic Press, 51(3), pp. 409-416. doi:10.1016/j.biocontrol.2009.07.018.

IHGC (2022) *Report Economic comission 2022*. Economic commission. Disponible en: <http://www.hmelj-giz.si/ihgc/obj.htm> (Accedido: 19 de mayo de 2023).

Ji, S., Liu, Z. y Wang, Y. (2021) "*Trichoderma*-induced ethylene responsive factor MsERF105 mediates defense responses in *Malus sieversii*", *Frontiers in plant science*, 12(10), pp. 1-13. doi:10.3389/fpls.2021.708010.

Kakabouki, I., Tataridas, A., Mavroeidis, A., Kousta, A., Karydogianni, S., Zisi, C., Kouneli, V., Konstantinou, A., Folina, A., Konstantas, A. y Papastylianou, P. (2021) "Effect of colonization of *Trichoderma harzianum* on growth development and CBD content of hemp (*Cannabis sativa* L.)", *Microorganisms*, 9(3), p. 518. doi:10.3390/microorganisms9030518.

Kunej, U., Jakše, J., Radišek, S. y Štajner, N. (2021) "Identification and characterization of *Verticillium nonalfalfae*-responsive microRNAs in the roots of resistant and susceptible hop cultivars", *Plants*. MDPI, 10(9), p. 1883. doi:10.3390/PLANTS10091883/S1.

Langezaal, C. R., Chandra, A. y Scheffer, J. J. C. (1992) "Antimicrobial screening of essential oils and extracts of some *Humulus lupulus* L. cultivars", *Pharmaceutisch weekblad scientific edition*, 14(6), pp. 353-356.

Latorre, B. A., Lillo, C. y Rioja, M. E. (2001) "Eficacia de los tratamientos fungicidas para el control de *Botrytis cinerea* de la vid en función de la época de aplicación.", *Ciencia e investigación agraria*, 28, pp. 61-66.

Leite, I. R., Faria, J. R., Marquez, L. D. S., Reis, M. H. M., De Resende, M. M., Ribeiro, E. J. y Cardoso, V. L. (2013) "Evaluation of hop extract as a natural antibacterial agent in contaminated fuel ethanol fermentations", *Fuel processing technology*. Elsevier, 106, pp. 611-618. doi:10.1016/J.FUPROC.2012.09.050.

Leslie, J. F. y Summerell, B. A. (2006) *The Fusarium laboratory manual*. Editado por J. F. Leslie y B. A. Summerell. Blackwell Publishing. doi:10.1002/9780470278376.

Levic, J., Stankovic, S., Krnjaja, V. y Bocarov-Stancic, A. (2009) "*Fusarium* species: The occurrence and the importance in agriculture of Serbia", *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, (116), pp. 33-48. doi:10.2298/zmspn0916033l.

Lobulu, J., Shimelis, H., Laing, M. D., Mushongi, A. A. y Shayanowako, A. I. T. (2021) "Characterization of maize genotypes (*Zea mays* L.) for resistance to *Striga asiatica* and *S. hermonthica* and compatibility with *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae* (FOS) in Tanzania", *Agronomy*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 11(5), p. 1004. doi:10.3390/AGRONOMY11051004.

Lorenzana, A., Hermoso de Mendoza, A., Seco, M. V. y Casquero, P. A. (2010) "Population development of *Phorodon humuli* and predators (*Orius* spp.) within hop cones: Influence of aphid density on hop quality", *Crop protection*. Elsevier Ltd, 29(8), pp. 832-837. doi:10.1016/j.cropro.2010.04.014.

Lorenzana de la Varga, A. y Romero Cuadrado, C. (eds.) (2023) *Guía de gestión integrada de plagas. Lúpulo*. Madrid, España: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Lumsden, R. D. (1992) "Mycoparasitism of soilborne plant pathogens", en Carroll, G. C. y Wicklow, D. T. (eds.) *The fungal community: its organization and role in the ecosystem*. second. Mycology series.

Luo, L., Zhao, C., Wang, E., Raza, A. y Yin, C. (2022) "*Bacillus amyloliquefaciens* as an excellent agent for biofertilizer and biocontrol in agriculture: An overview for its mechanisms", *Microbiological research*. Urban & Fischer, 259, p. 127016. doi:10.1016/J.MICRES.2022.127016.

Luskar, L., Polanšek, J., Hladnik, A. y Čeh, B. (2022) "On-farm composting of hop plant green waste - chemical and biological value of compost", *Applied sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 12(9), p. 4190. doi:10.3390/app12094190.

Magadán, J. A., Fomento, M.-S. A. E., Lúpulo, D., Luís, J., Nadal -Hijos De Rivera, O., Juan, S. A., Andiñón -Ciam, P., Valladares, J., José, A.-C., García Pedreira-Ramisquido, M., Jaime Fernández Paz -Lafiga, S. L., Marcos, J. A. M., Nadal, J. L. O., Andiñón, J. P., Alonso, J. V., Pedreira, J. M. G. y Paz, J. F. (2011) "Guía del cultivo del lúpulo", *Centro Investigaciones Agrarias de Mabegondo*.

Mahaffee, W. F., Pethybridge, S. J. y Gent, D. H. (2009) *Compendium of hop diseases and pests*. American Phytopathological Society (APS Press).

MAPA (2021) *Anuario de estadística*. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/estadistica/pags/anuario/2021/ANUARIO/AE_2021.pdf (Accedido: 23 de abril de 2023).

MAPA (2023) *Registro de productos fitosanitarios, Ministerio de agricultura, pesca y alimentación*. Disponible en: <https://servicio.mapa.gob.es/regfiweb#> (Accedido: 8 de mayo de 2023).

Martínez-Medina, A., Del Mar Alguacil, M., Pascual, J. A. y Van Wees, S. C. M. (2014) "Phytohormone profiles induced by *Trichoderma* isolates correspond with their biocontrol and plant growth-promoting activity on melon plants", *Journal of chemical ecology*, 40(7), pp. 804-815. doi:10.1007/s10886-014-0478-1.

Mayo-Prieto, S., Marra, R., Vinale, F., Rodríguez-González, Á., Woo, S. L., Lorito, M., Gutiérrez, S. y Casquero, P. A. (2019) "Effect of *Trichoderma velutinum* and *Rhizoctonia solani* on the metabolome of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.)", *International journal of molecular sciences*. MDPI AG, 20(3). doi:10.3390/ijms20030549.

Mayo, S., Cominelli, E., Sparvoli, F., González-López, O., Rodríguez-González, A., Gutiérrez, S. y Casquero, P. A. (2016) "Development of a qPCR strategy to select bean genes involved in plant defense response and regulated by the *Trichoderma velutinum* - *Rhizoctonia solani* interaction", *Frontiers in plant science*, 7, p. 1109. doi:10.3389/fpls.2016.01109.

Mayo, S., Gutiérrez, S., Malmierca, M. G., Lorenzana, A., Campelo, M. P., Hermosa, R. y Casquero, P. A. (2015) "Influence of *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma* spp. in growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and in the induction of plant defense-related genes.", *Frontiers in plant science*, 6, p. 685. doi:10.3389/fpls.2015.00685.

Menéndez, A. B. (1996) *Micoparasitismo de Trichoderma spp. sobre el patógeno vegetal de suelo Sclerotinia sclerotiorum: pruebas preliminares sobre el biocontrol de esta enfermedad*. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires.

De Meyer, G., Bigirimana, J., Elad, Y. y Höfte, M. (1998) "Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*", *European journal of plant pathology*, 104(3), pp. 279-286. doi:10.1023/A:1008628806616.

Mineco (2015) *Estrategia española de Bioeconomía. Horizonte 2030*.

Mironenka, J., Różalska, S., Soboń, A. y Bernat, P. (2021) "*Trichoderma harzianum* metabolites disturb *Fusarium culmorum* metabolism: Metabolomic and proteomic studies", *Microbiological research*, 249(11), p. 126770. doi:10.1016/j.micres.2021.126770.

Morgavi, D. P. y Riley, R. T. (2007) "An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins", *Animal feed science and technology*. Elsevier, 137(3-4), pp. 201-212. doi:10.1016/J.ANIFEEDSCI.2007.06.002.

Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A. y Kenerley, C. M. (2012) "Secondary metabolism in *Trichoderma* - a genomic perspective", *Microbiology*, 158(1), pp. 35-45. doi:10.1099/mic.0.053629-0.

Murakami, A., Darby, P., Javornik, B., Pais, M. S. S., Seigner, E., Lutz, A. y Svoboda, P. (2006) "Molecular phylogeny of wild hops, *Humulus lupulus* L.", *Heredity*, 97(1), pp. 66-74. doi:10.1038/sj.hdy.6800839.

Neve, R. A. (1991) *Hops*. 1st ed. Suffolk: Chapman and Hall. doi:10.1007/978-94-011-3106-3.

Nieto-Jacobo, M. F., Steyaert, J. M., Salazar-Badillo, F. B., Nguyen, D. V., Rostás, M., Braithwaite, M., De Souza, J. T., Jimenez-Bremont, J. F., Ohkura, M., Stewart, A. y Mendoza-Mendoza, A. (2017) "Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion", *Frontiers in plant science*. Frontiers Media S.A., 8. doi:10.3389/fpls.2017.00102.

O'Neal, S. D., Walsh, D. B., Gent, D. H., Barbour, J. D., Boydston, R. A., George, A. E., James, D. G. y Serrine, J. R. (eds.) (2015) *Field guide for integrated pest management in hops*. Third Edit, *Washington State University, Oregon State University, University of Idaho, and U.S. Department of Agriculture in cooperation with Michigan State University, and Cornell University*. Third Edit. Pullman, WA: U.S. Hop industry plant protection committee.

ONU (1992) *Informe de la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo*. Rio de Janeiro.

Pandya, J. R., Sabalpara, A. N. y Chawda, S. K. (2011) "*Trichoderma*: a particular weapon for biological control of phytopathogens", *Journal of agricultural technology*, 7(5), pp. 1187-1191.

- Papavizas, G. C. (1985) "*Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol.", *Annual review of phytopathology*, 23, pp. 23-54.
- Periest, S. (1962) "Studies on strawberry mildew, caused by *Sphaerotheca macularis* (Wallr. ex Fries) Jaczewski", *Annals of applied biology*, 50, pp. 211-224.
- Pethybridge, S. J., Hay, F. S., Barbara, D. J., Eastwell, K. C. y Wilson, C. R. (2008) "Viruses and viroids infecting hop: significance, epidemiology, and management", *Plant disease*, pp. 324-338. doi:10.1094/PDIS-92-3-0324.
- Pethybridge, S. J., Hay, F. S., Wilson, C. R., Sherriff, L. J. y Leggett, G. W. (2001) "First report of *Fusarium crookwellense* causing tip blight on cones of hop", *Plant disease*, 85(11), pp. 1208-1208. doi:10.1094/PDIS.2001.85.11.1208A.
- Pethybridge, S. J., Wilson, C. R., Hay, F. S., Leggett, G. W. y Sherriff, L. J. (2002) "Mechanical transmission of Apple mosaic virus in Australian hop (*Humulus lupulus*) gardens", *Annals of applied biology*. Association of Applied Biologists, 141(1), pp. 77-85. doi:10.1111/j.1744-7348.2002.tb00198.x.
- Pinto, F. A. M. F., Araujo, L., de Andrade, C. C. L., Mendes Fagherazzi, M., Fontanella Brighenti, A., Schlichting de Martin, M., Gomes, L. B., Fernandes, J., Duarte, V., João Arioli, C. y Sommer, V. B. (2022) "First report of *Fusarium meridionale* causing canker in hop plants", *Australasian plant disease notes*, 17(1), p. 13. doi:10.1007/s13314-022-00462-2.
- Pollach, G., Hein, W. y Beddie, D. (2002) "Application of hop β -acids and rosin acids in the sugar industry", *Zuckerindustrie*, 127(12), pp. 921-930.
- Porteous-Álvarez, A. J., Maldonado-González, M. M., Mayo-Prieto, S., Lorenzana, A., Paniagua-García, A. I. y Casquero, P. A. (2021) "Green strategies of powdery mildew control in hop: from organic products to nanoscale carriers", *Journal of fungi*. MDPI AG, 7(6), p. 490. doi:10.3390/jof7060490.
- Porteous-Álvarez, A. J., Mayo-Prieto, S., Álvarez-García, S., Reinoso, B. y Casquero, P. A. (2020) "Genetic response of common bean to the inoculation with indigenous *Fusarium* isolates", *Journal of fungi*. MDPI AG, 6(4), p. 228. doi:10.3390/jof6040228.
- Postman, J. D., DeNoma, J. S. y Reed, B. M. (2005) "Detection and elimination of viruses in USDA hop (*Humulus lupulus*) germplasm collection", *Acta horticulturae*, 668, pp. 143-147.
- Poveda, J., Eugui, Daniel, Abril-Urias, P. y Eugui, D (2020) "Could *Trichoderma* be a plant pathogen? Successful root colonization", en Sharma, A. y Sharma P. (eds.) *Trichoderma. Rhizosphere biology*. Springer, Singapore, pp. 35-59. doi:10.1007/978-981-15-3321-1_3.
- Pscheidt, J. W. y Ocamp, C. M. (eds.) (2021) "Hop (*Humulus lupulus*)-*Fusarium* Canker (Wilt)", en *Pacific northwest plant disease management handbook*. Corvallis, OR: Oregon State University. Disponible en: <https://pnwhandbooks.org/node/2891/print> (Accedido: 25 de enero de 2021).
- Purayannur, S., Gent, D. H., Miles, T. D., Radišek, S. y Quesada-Ocampo, L. M. (2021) "The hop downy mildew pathogen *Pseudoperonospora humuli*", *Molecular plant pathology*. Blackwell Publishing Ltd, 22(7), pp. 755-768. doi:10.1111/mpp.13063.

- Radišek, S., Jakše, J. y Javornik, B. (2006) "Genetic variability and virulence among *Verticillium albo-atrum* isolates from hop", *European journal of plant pathology*, 116(4), pp. 301-314. doi:10.1007/s10658-006-9061-0.
- Rodríguez-González, A., Carro-Huerga, G., Mayo-Prieto, S., Lorenzana, A., Gutiérrez, S., Peláez, H. J. y Casquero, P. A. (2018) "Investigations of *Trichoderma* spp. and *Beauveria bassiana* as biological control agent for *Xylotrechus arvicola*, a major insect pest in spanish vineyards", *Journal of economic entomology*. Oxford University Press, 111(6), pp. 2585-2591. doi:10.1093/jee/toy256.
- Rodríguez-González, Á., Casquero, P. A., Suárez-Villanueva, V., Carro-Huerga, G., Álvarez-García, S., Mayo-Prieto, S., Lorenzana, A., Cardoza, R. E. y Gutiérrez, S. (2018) "Effect of trichodiene production by *Trichoderma harzianum* on *Acanthoscelides obtectus*", *Journal of stored products research*. Pergamon, 77, pp. 231-239. doi:10.1016/J.JSPR.2018.05.001.
- Rodríguez-González, Á., Mayo, S., González-López, Ó., Reinoso, B., Gutierrez, S. y Casquero, P. A. (2017) "Inhibitory activity of *Beauveria bassiana* and *Trichoderma* spp. on the insect pests *Xylotrechus arvicola* (Coleoptera: Cerambycidae) and *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae)", *Environmental monitoring and assessment*. Springer International Publishing, 189(1), p. 12. doi:10.1007/s10661-016-5719-z.
- Rodríguez-González, Á., Porteous-Álvarez, A. J., Guerra, M., González-López, Ó., Casquero, P. A. y Escriche, B. (2022) "Effect of cry toxins on *Xylotrechus arvicola* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae", *Insects*. MDPI, 13(1). doi:10.3390/insects13010027.
- Rodríguez-González, Á., Porteous-Álvarez, A. J., Val, M. Del, Casquero, P. A. y Escriche, B. (2020) "Toxicity of five Cry proteins against the insect pest *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae)", *Journal of invertebrate pathology*. Elsevier Inc., 169, p. 107295. doi:10.1016/j.jip.2019.107295.
- Royle, D. J. (1978) "Powdery mildew of the hop", en *The Powdery Mildews*. New York: D. M. Spencer, pp. 381-409.
- Saba, H., Vibhash, D., Manisha, M., Prashant, K. S., Farhan, H. y Tauseef, A. (2012) "*Trichoderma* - a promising plant growth stimulator and biocontrol agent", *Mycosphere*, 3(4), pp. 524-531. doi:10.5943/mycosphere/3/4/14.
- Sabo, J., Duric, T. y Jasnic, S. (2002) "*Fusarium* fungi as a pathogen causing hop wilt", *Plant protection science*. Prague, pp. 308-310.
- Salmon, E. S. (1907) *Notes on the hop mildew (Sphaerotheca humuli (DC.) Burr.)*.
- Scarselletti, R. y Faull, J. L. (1994) "*In vitro* activity of 6-pentyl- α -pyrone, a metabolite of *Trichoderma harzianum*, in the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*", *Mycological research*, 98(10), pp. 1207-1209. doi:10.1016/S0953-7562(09)80206-2.
- Schoental, R. (1994) "Mycotoxins in food and the plague of Athens", *Journal of nutritional medicine*. Taylor & Francis, 4(1), pp. 83-85. doi:10.3109/13590849409034541.
- Shoresh, M., Harman, G. E. y Mastouri, F. (2010) "Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents", *Annual review of phytopathology*. Annual Reviews, 48(1), pp. 21-43. doi:10.1146/annurev-phyto-073009-114450.

Shoresh, M., Yedidia, I. y Chet, I. (2005) "Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203", *Phytopathology*, 95(1), pp. 76-84. doi:10.1094/PHYTO-95-0076.

Singh, S. P., Pandey, S., Mishra, N., Giri, V. P., Mahfooz, S., Bhattacharya, A., Kumari, M., Chauhan, P., Verma, P., Nautiyal, C. S. y Mishra, A. (2019) "Supplementation of *Trichoderma* improves the alteration of nutrient allocation and transporter genes expression in rice under nutrient deficiencies", *Plant physiology and biochemistry*. Elsevier Masson SAS, 143, pp. 351-363. doi:10.1016/j.plaphy.2019.09.015.

Singh, S. R., Walters, K. F. A., Port, G. R. y Northing, P. (2004) "Consumption rates and predatory activity of adult and fourth instar larvae of the seven spot ladybird, *Coccinella septempunctata* L., following contact with dimethoate residue and contaminated prey in laboratory arenas", *Biological control*. Academic Press Inc., 30(2), pp. 127-133. doi:10.1016/J.BIOCONTROL.2004.01.003.

Sivan, A. y Chet, I. (1989) "Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*", *Microbiology*, 135(3), pp. 675-682.

Sivan, A. y Chet, I. (1993) "Integrated control of *Fusarium* crown and root rot of tomato with *Trichoderma harzianum* in combination with methyl bromide or soil solarization", *Crop protection*, 12(5), pp. 380-386. doi:10.1016/0261-2194(93)90082-T.

Small, E. (1978) "A numerical and nomenclatural analysis of morpho-geographic taxa of *Humulus*", *Systematic Botany*, 3(1), p. 37. doi:10.2307/2418532.

Štajner, N., Cregeen, S. y Javornik, B. (2013) "Evaluation of reference genes for RT-qPCR expression studies in hop (*Humulus lupulus* L.) during infection with vascular pathogen *Verticillium albo-atrum*", *PLoS ONE*. Editado por B. Chatterjee. Public Library of Science, 8(7), p. e68228. doi:10.1371/journal.pone.0068228.

Thresh, J. M. (2006) "Plant virus epidemiology: the concept of host genetic vulnerability", en *Advances in virus research*, pp. 89-125. doi:10.1016/S0065-3527(06)67003-6.

Vidal Vademecum Spain (2023) *Tranquigor 125/27,8 mg cápsulas blandas*, *Ficha técnica*. Disponible en: https://www.vademecum.es/medicamento-tranquigor_ficha_22676 (Accedido: 20 de mayo de 2023).

Vinale, F., Nigro, M., Sivasithamparam, K., Flematti, G., Ghisalberti, E. L., Ruocco, M., Varlese, R., Marra, R., Lanzuise, S., Eid, A., Woo, S. L. y Lorito, M. (2013) "Harzianic acid: A novel siderophore from *Trichoderma harzianum*", *FEMS Microbiology letters*, 347(2), pp. 123-129. doi:10.1111/1574-6968.12231.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L. y Lorito, M. (2008) "*Trichoderma*-plant-pathogen interactions", *Soil biology and biochemistry*. Pergamon, 40(1), pp. 1-10. doi:10.1016/J.SOILBIO.2007.07.002.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Ruocco, M., Woo, S. y Lorito, M. (2012) "*Trichoderma* secondary metabolites that affect plant metabolism", *Natural product communications*, 7(11), pp. 1545-1550. doi:10.1177/1934578X1200701133.

Weber, N., Biehler, K., Schwabe, K., Haarhaus, B., Quirin, K. W., Frank, U., Schempp, C. M. y Wölfle, U. (2019) "Hop extract acts as an antioxidant with antimicrobial

effects against *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus*", *Molecules*. MDPI AG, 24(2). doi:10.3390/molecules24020223.

Weldon, W. A., Gent, D. H. y Gadoury, D. M. (2021) "Management of hop powdery mildew in the context of recent advances in pathogen ecology and population genetics", *Plant health progress*. American Phytopathological Society, 22(4), pp. 450-458. doi:10.1094/PHP-03-21-0065-SYN.

Weldon, W. A., Ullrich, M. R., Smart, L. B., Smart, C. D. y Gadoury, D. M. (2020) "Cross-infectivity of powdery mildew isolates originating from hemp (*Cannabis sativa*) and japanese hop (*Humulus japonicus*) in New York", *Plant health progress*. American Phytopathological Society, 21(1), pp. 47-53. doi:10.1094/PHP-09-19-0067-RS/ASSET/IMAGES/LARGE/PHP-09-19-0067-RSF6.JPEG.

Wolfenbarger, S. N., Massie, S. T., Ocamb, C., Eck, E. B., Grove, G. G., Nelson, M. E., Probst, C., Twomey, M. C. y Gent, D. H. (2016) "Distribution and characterization of *Podosphaera macularis* virulent on hop cultivars possessing R6-based resistance to powdery mildew", *Plant disease*. American Phytopathological Society, 100(6), pp. 1212-1221. doi:10.1094/PDIS-12-15-1449-RE/ASSET/IMAGES/LARGE/PDIS-12-15-1449-RE_T4.JPEG.

Woods, J. L., Iskra, A. E. y Gent, D. H. (2021) "Predicting damage to hop cones by *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae)", *Environmental entomology*, 50(3), pp. 673-684. doi:10.1093/ee/nvab008.

Zewdu, G. A. y Tsehai, B. A. (2023) "The potential of gesho (*Rhamnus prinoides* L. *herit*) as substitutes for hop (*Humulus lupulus*) in beer production", *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*. Slovak University of Agriculture, 12(4). doi:10.55251/jmbfs.4710.



Justificación y Objetivos



Justificación y Objetivos

La producción agrícola y ganadera actual tiene diversos desafíos. Por un lado, el aumento de la población mundial que se prevé en los próximos años, y por otro, las consecuencias que el cambio climático puede tener en la alteración de los ecosistemas tal cual se conocen en la actualidad. La Política Agraria Común (PAC) apuesta por una producción integrada para el manejo de plagas y enfermedades de los cultivos, en la que se reduce el número de productos de síntesis química autorizados en agricultura y, en compensación, se da prioridad al uso de métodos no químicos descritos en la producción integrada, como el uso de agentes de control biológico. De acuerdo con la estrategia de bioeconomía circular, se debe generar valor en residuos de origen vegetal obteniendo productos revalorizados de forma eficiente y sostenible.

El lúpulo se ve afectado por plagas y enfermedades que causan pérdidas económicas importantes. Las principales enfermedades y plagas que afectan a este cultivo son el mildiu, el oídio, *Verticillium*, *Fusarium*, el pulgón y la araña roja. Hasta ahora, se ha estudiado con detalle al pulgón del lúpulo, desarrollando programas de muestreo y evaluando sus daños. Teniendo en cuenta la escasez de productos fitosanitarios autorizados y eco-compatibles desarrollados para la defensa en el cultivo del lúpulo y la alta demanda del producto por su importancia en la industria cervecera, hace que la obtención de producción sana sea un reto para los agricultores.

Con el empleo de agentes de biocontrol como *Trichoderma* se podrían controlar los principales problemas fitosanitarios del cultivo de lúpulo. Este microorganismo compite de forma directa con fitopatógenos y hace que se activen los genes de defensa de la planta, de tal forma que ésta es capaz de resistir su ataque. Asimismo, *Trichoderma* podría promover el desarrollo y la calidad del lúpulo, sin interferir con la fauna auxiliar y sin dejar residuos en la planta. Por tanto, se lograría un cultivo sostenible a largo plazo sin contaminación ambiental.

La presente tesis es un paso más en el objetivo de mejorar y añadir nuevas estrategias de control de plagas y enfermedades en el cultivo del lúpulo (*Humulus lupulus* L.) fomentando la bioeconomía circular de los desechos generados durante su cultivo. Los objetivos específicos se enumeran a continuación.

- Evaluar los productos autorizados y el uso de la nanotecnología para un control eficiente del oídio en la hoja y el cono del lúpulo.
- Recolectar e identificar microorganismos autóctonos del género *Trichoderma* adaptados al cultivo de lúpulo.
- Evaluar la capacidad de biocontrol de los aislados autóctonos de *Trichoderma* frente a hongos patógenos del lúpulo.

-
- Evaluar la capacidad de los aislamientos autóctonos de *Trichoderma* para la promoción de crecimiento de plántulas de lúpulo.
 - Evaluar residuos del lúpulo como fuente de carbono para elaborar inoculantes basados en microorganismos autóctonos.



Capítulo 1

**“Green strategies of powdery mildew control in hop:
from organic products to nanoscale carriers”**

Alejandra J. Porteous-Álvarez, M. Mercedes Maldonado-González, Sara Mayo-Prieto,
Alicia Lorenzana, Ana I. Paniagua-García y Pedro A. Casquero

J. Fungi 2021, 7, 490. <https://doi.org/10.3390/jof7060490>



Green Strategies of Powdery Mildew Control in Hop: From Organic Products to Nanoscale Carriers

Alejandra J. Porteous-Álvarez; M. Mercedes Maldonado-González; Sara Mayo-Prieto; Alicia Lorenzana; Ana I. Paniagua-García; Pedro A. Casquero

J. Fungi 2021, Volume 7, Issue 6, 490

Resumen

Abstract: *Humulus lupulus* L. is a long-lived, perennial, herbaceous, and dioecious climbing plant. The foremost producers in the European Union are Germany, the Czech Republic, Poland, Slovenia, and Spain. The Spanish cultivated area is concentrated in the province of León. Powdery mildew, caused by *Podosphaera macularis*, menaces hop production and quality in all hop growing regions located in the Northern hemisphere, colonizing leaves, petioles, inflorescences, and finally cones. In this work, powdery mildew control was monitored, comparing nine fungicide strategies: five organics, two integrated disease management (IDM)-based, with and without Nutragreen® nanoscale carrier, and two conventional treatments (CON) with and without Nutragreen® nanoscale carrier. The organic treatments were able to diminish *P. macularis* on leaves, but no effect was observed in cones. CON treatments reduced the infection on leaves and cones and increased the cone quantity and quality. Likewise, IDM-based treatments provided satisfactory results as they diminished powdery mildew on leaves and cones. Finally, dose reduction using a Nutragreen® nanoscale carrier showed beneficial effects in the control of powdery mildew compared to the commercial dose. Hence, the use of nanoscale carriers permits a 30% reduction in pesticide dose, which optimizes yield and hop quality, reduces risks linked to pesticides, and aids in compliance with public and international policy demands.

Keywords: *Humulus lupulus*, *Podosphaera macularis*, yield index; α -acids yield; nanoscale carriers; fungicides; Nugget cultivar; integrated disease management



Capítulo 2

“Native *Trichoderma* isolates from soil and rootstock to *Fusarium* spp. control and growth promotion of *Humulus lupulus* L. plantlets”

Alejandra J. Porteous-Álvarez, Alexia Fernández-Marcos, Daniela Ramírez-Lozano, Sara Mayo-Prieto, Rosa E. Cardoza, Santiago Gutiérrez y Pedro A. Casquero

Agriculture 2023, 13, 720. <https://doi.org/10.3390/agriculture13030720>



Native *Trichoderma* Isolates from Soil and Rootstock to *Fusarium* spp. Control and Growth Promotion of *Humulus lupulus* L. Plantlets

Alejandra J. Porteous-Álvarez; Alexia Fernández-Marcos; Daniela Ramírez-Lozano; Sara Mayo-Prieto; Rosa E. Cardoza; Santiago Gutiérrez; Pedro A. Casquero

Agriculture 2023, Volume 13, Issue 3, 720

Resumen

Abstract: *Fusarium* genus is a wide host phytopathogen causing significant losses in multiple crops, including hops. There is limited information on the sustainable management of *Fusarium* spp. in hop fields. *Trichoderma* is an endophytic fungus used in agriculture as a biological control agent (BCA) and as a plant growth promoter. It has been used to antagonize *Fusarium* spp. in other crops. The objective of the current study was to identify indigenous hop field *Trichoderma* isolates with biocontrol and hop growth promotion capabilities. Three isolates of *Fusarium* and eleven autochthonous *Trichoderma* isolates collected from sustainable hop fields were evaluated in this work. Direct confrontation tests (the physical interaction between the pathogen and BCA and their competition for space and nutrient resources) and membrane tests (the capacity of the BCA to produce metabolites or enzymes through a cellophane film and inhibit the development of the pathogen) assessed the antagonism of these *Trichoderma* isolates against *Fusarium culmorum*, *F. sambucinum*, and *F. oxysporum*. A bioassay with hop plantlets inoculated with a spore suspension of *Trichoderma* was performed to assess its hop growth enhancement. *T. hamatum* (T311 and T324), *T. virens* T312, and *T. gamsii* T327 showed high growth inhibition of *Fusarium* spp. phytopathogens and high plant growth promotion. Native *Trichoderma* isolates from sustainable hop-producing soils have great potential as BCAs and hop growth promoters.

Keywords: hops; biological control; antifungal activity; plant-growth promotion; soil microorganisms; sustainable agriculture; direct confrontation; dual culture; membrane assay



Material suplementario

Capítulo 2



Material suplementario

Para la identificación de *Trichoderma spp.* del Capítulo 2, se amplificó un fragmento de la región ITS usando los oligonucleótidos

ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') y,

ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

Las secuencias obtenidas para cada uno de los aislamientos de *Trichoderma* se recogen a continuación:

T. hamatum T311

GCTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCC-
CAAACCCAATGTGAACGT-
TACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTAAAAGCCCC
GGAACCAGGCGCCCGCCGGAGGAACCAACCAA-
ACTCTTTCTGTAGTCCCCCTCGCG-
GACGTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAAAACTTTC
AACAAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA-
ATGCGA-
TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
CATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTT-
CAACCCTCGAAC-
CCCTCCGGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCACCGGGTGCCGGC
CCTGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTT-
GCACAACTCGCAC-
CGGGAGCGCGGCGCGTCCACGTCCGTAAAACACCCAACTTCTGAAATGTT
GACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA-
TAAACGGAGAGAGA

T. virens T312

GTCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAA-
TGTGAACGTTACCAAACCTGTT-
GCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTTCGAGCCCCGGACCAAGGCG
CCCGCCGGAGGACCAACCAAAACTCTTATTGTATAC-
CCCCTCGCGGGTTTTTTACTA-
TCTGAGCCATCTCGGCGCCCCCTCGTGGGCGTTTCGAAAATGAATCAAAAC
TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA-
ATGCGA-
TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA

CATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTT-
CAACCCCTCGAAC-
CCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTTTACGGGGCCGGCCCC
GAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCA-
CACTCGCATCGG-
GAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTTG
ACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA-
TAAGCGGGAGGA

***T. spirale* T314**

CGTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCC-
CAAACCCAATGTGAACGT-
TACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTTCGTCGCAGCCC
CGGACCAAGGCGCCCGCCGGAGGACCAACCAAAACTCTTTTGTATAC-
CCCCTCGCGGGTTTT-
TATATCTGAGCCATCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCA
AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA-
GCGAAATGCGA-
TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
CATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTT-
CAACCCCTCGAAC-
CCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTTTACGGGGCCGGCCCC
GAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCA-
CACTCGCATCGG-
GAGCGCGGCGCGTCCATTGCCGTAAAACACCCAACTTTCTGAAATGTTGA
CCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCG-
GAGGA

***T. rossicum* T316**

TGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAAC-
CCAATGTGAACGTTAC-
CAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGCGCGTCGCAGCCCCGG
ACCAAGGCGCCCGCCGGAGGACCAACCAAAACTCTTTTGTATAC-
CCCCTCGCGGGTTTT-
TACTTCTGAGAATTTCTCGGCGCCCCTAGTGGGCGTTTCGAAAATGAATC
AAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA-
GCGAAATGCGA-
TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
CATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTT-
CAACCCCTCGAAC-
CCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTTTCACCGGGTCCGGCC
CCTAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCATGCGCAGTAGTTT-
GCACACTCGCAC-
CGGGAGCGCGGCGCGTCCACGTCCGTAAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGT
TGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA-
TAAGCGGAGGA

***T. virens* T317**

GGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACC-
CAATGTGAACGTTAC-
CAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGG
ACCAAGGCGCCCCGCGGAGGACCAACCAAAACTCTTATTGTATAC-
CCCCTCGCGGGTTTTT-
TACTATCTGAGCCATCTCGGCGCCCCTCGTGGGCGTTTTCGAAAATGAATC
AAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA-
GCGAAATGCGA-
TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
CATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTT-
CAACCCTCGAAC-
CCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTTTACGGGGCCGGCCCC
GAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCA-
CACTCGCATCGG-
GAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTTG
ACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA-
AAAAGGGGGAGAGAGAAAA

***T. spirale* T319**

CGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCC-
CAAACCCAATGTGAACGT-
TACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTCGCAGCCC
CGGACCAAGGCGCCCCGCGGAGGACCAACCAAAACTCTTTTGTATAC-
CCCCTCGCGGGTTTT-
TATATCTGAGCCATCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTTCGAAAATGAATCA
AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA-
GCGAAATGCGA-
TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
CATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTT-
CAACCCTCGAAC-
CCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTTTACGGGGCCGGCCCC
GAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCA-
CACTCGCATCGG-
GAGCGCGGCGCGTCCATTGCCGTTAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTTGA
CCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCG-
GAGG

***T. brevicompactum* T323**

GCCTTTTGGTGTACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAA-
CTCCCAAACCCCTA-
TGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATTTCTGCCCGGGCGCG
TCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCCGCGGAGGACCAATTTACAA-
ACTCTTTTGTATATCC-
CATCGCGGATTCTTTACATTCTGAGCTTTCTCGGCGCTCCTAGCGAGCGT

TTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTT-
GGTTCTGGCATCGATGAAGAA-
CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC
GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCA-
GTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGT-
CATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCACT
TACCTGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCA-
GCCTCTCCTGCGCAGTAGTTT-
GCACACTCGCACCGGGAGCGCGGCGGTCCACGGCCGTAAAACAACCCAA
ACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACT-
TAAGCATATCATAGGCGCGGAAAGGAA

***T. hamatum* T324**

GGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACC-
CAATGTGAACGTTAC-
CAAACCTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTAAAAGCCCCGGA
ACCAGGCGCCCGCCGGTGGAAACCAACCAA-
ACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGTTCGTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAA
ATTCAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTT-
GGTTCTGGCATCGATGAAGAA-
CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC
GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCA-
GTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGT-
CATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGATTCGGCGTTGGGGATCGGGACC
CCTCACCGGGTGCCGGCCCTGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCA-
GCCTCTCCTGCGCA-
GTAGTTTGCACAACTCGCACCGGGAGCGCGGCGGTCCACGTCCGTAAAA
CACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC-
CCGCTGAACTTAAGCATATCAAAAAAGGGGGAGAGAGAAAAA

***T. harzianum* T327**

TGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAAC-
CCAATGTGAACCATAC-
CAAACCTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTTCGAGCCCCGGA
ACCAGGCGCCCGCCGGAGGGACCAACCAA-
ACTCTTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGT-
TATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAAAACTTTCAACA
ACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA-
TAAGTAATGTGAATT-
GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAG
TATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAAC-
CCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGGAACCCCTAAGACGGGATCCC
GGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCA-
GTAGTTTGCACAA-
CTCGCACCGGGAGCGCGGCGGTCCACGTCCGTAAAACACCCAACCTTCTG
AAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT-
CAATAAGGGGGGAGAGAG

***T. rossicum* T328**

TGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAAC-
CCAATGTGAACGTTAC-
CAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGCGCGTCCGAGCCCCGG
ACCAAGGCGCCCGCCGGAGGACCAACCCAAAACCTCTTTTTGTATAC-
CCCCTCGCGGGTTTTTTTTACTTCTGAGAACTTCTCGGCGCCCCTAGCGG
GCGTTTTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTT-
GGTTCTGGCATCGATGAA-
GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC
ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCA-
GTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGT-
CATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTCCGGCGTTGGGGATCGGCCCT
TTCACCGGGTGCCGGCCCCTAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCT-
CATGCGCA-
GTAGTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGCGGCGGTCCACGTCCGTAAAAC
ACCCCAAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC-
CCGCTGAACTTAAGCATATCAAAAAGGGGGGAGAGAGAAA

***T. harzianum* T329**

TGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAAC-
CCAATGTGAACGTTAC-
CAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCCGAGCCCCGG
ACCAAGGCGCCCGCCGGAGGACCAACCTAAAACCTTTATTGTATAC-
CCCCTCGCGGGTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAG
GCGTTTTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTT-
GGTTCTGGCATCGATGAA-
GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC
ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCA-
GTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGT-
CATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTCCGGCGTTGGGGATCGGCCCT
CCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCA-
GCCTCTCCTGCGCA-
GTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGGTCCACAGCCGTAAAC
ACCCAACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAA-
CTTAAGCATATCAAAAAGGGGGGGGAGAAAAAA

Para la identificación de *Fusarium spp.* se amplificó un fragmento interno del gen *tef1* usando los oligonucleótidos

EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') y,

EF1-986R (5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3')

Las secuencias obtenidas se recogen a continuación para cada uno de los aislamientos de *Fusarium*.

***F. culmorum* F076**

TCGTCATCGGCCACGTCGACTCTGGCAGTCGACCACTGTGAGTAC-
CACTGCATCCCAAC-
CCCGCCGATACTTGGCGGGGTAGTTTCAAATTTCCAATGTGCTGACATAC
TTTGATAGACCGGTCACCTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAA-
GCGAACCATCGAGAA-
GTTTCGAGAAGGTTGGTCTCATTTCCTCGATCGCGCGCCCTTTTCCCTTT
CGAAACATCATTGGAATCGCCCTCACACGACGACTCGATACGCGCCTGT-
TAC-
CCCGCTCGAGGTCAAAAATTTTGGCGCTTTGTCGTAATTTTTCTGGTGGG
GCTCATACCCCGCCACTCGAGCGACAGGCGCTTGCCCTCTTCCCACAAAC-
CATTCCCTAGGCGCGCACCATCACGTGTCAATCAGTTACTAACCACCTGTC
AATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGTAAGGGTTCCCTTCAA-
GTACGCCTGGGTTCTTGACAAGCT-
CAAAGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATTGATATCGCTCTCTGGAAGT
TCGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCAC-
TACTGCTGTCATCA-
CATTCTCATACTAACACGACTATCAGACGCTCCCGGTCACCGTGATTTTCAT
CAAGAACATGATCCGGGGTTTCCTTCCCAA

***F. sambucinum* F079**

ATCGTCATCGGCCACGTCGACTCTGGCAAGTCGACCACTGTAAGTT-
GACCCAA-
ATCTAAGCTCGCCTACAATTGGCGGGGTAGCCTCAAGATACGCTTGTGCT
GACATACATCATAGACCGGTCACCTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGA-
CAAGCGAAC-
CATCGAGAAGTTTCGAGAAGGTTGGTCTCATTTCCTCGATCGCGCGCCCT
ACTTTCCATCGATCCATCATTGGAATCGCTCTGATACGACTCGACA-
CACGCCTGCTAC-
CCCGCTCGAGTTCAAAAATTTTACGACTTTGTCGTAATTTTTTTGGTGGG
GCTCATACCCCGCCACTTGAGCGACATGCCCTTCCTCTAAAGC-
CACGGGCGCGCATCAT-
CACGTGTTGATCAGTTACTAACAACCTGTCAATAGGAAGCCGCCGAGCTC
GGTAAGGGTTCTTTCAAGTACGCTTGGGTTCTTGACAAGCTCAA-
AGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATCGCTCTCTGGAAGTTTCG
AGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCACTACCAC-
CTCCATCA-
CATTCCCGCACTAACTCACCTATCAGACGCTCCCGGTCACCGTGATTTTCAT
CAAGAACATGATCATGTGTGTATTACCCACAA

***F. oxysporum* F103**

TCGTCATCGGCCACGTCGACTCTGGCAAGTCGAC-
CACTGTGAGTACTCTCCTCGACAA-
TGAGCATATCTGCCATCGTCAATCCCGACCAAGACCTGGCGGGGTATTTTC
TCAAAGTCAACATACTGACATCGTTTTACAGACCGGTCACTTGATCTAC-
CA-
GTGCGGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTTCGAGAAGGTTAGTC
ACTTTCCCTTCAATCGCGCGTCCTTTGCC-
CATCGATTTCCCCTACGACTCGAA-
ACGTGCCCGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAATTTTGCAATATGACCGTAAT
TTTTTTGGTGGGGCACTTACCCCGCCACTTGAGCGACGGGAGCGTTT-
GCCCTCTTAC-
CATTCTCAGAACCTCAATGAGTGCGTCGTCAAGCAGTCACTAA
CCATTCAACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAA-
GTACGCCTGGGTTCCT-
GACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATTGCTCT
CTGGAAGTTTCGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTT-
GTCGCTCATGCTT-
CATTCTACTTCTCTTCGTACTAACATATCACTCAGACGCTCCCGGTCACCG
TGATTTTCATCAAGAACATGATCATGTGGTTTTACTCTAACA



Capítulo 3

Patente: “Recubrimiento de semilla que comprende un agente de biocontrol y conos de lúpulo”

Pedro A. Casquero, Sara Mayo-Prieto, Álvaro Rodríguez-González, Guzmán Carro-Huerga, Samuel Álvarez-García, Alejandra J. Porteous-Alvarez, Sara del Ser-Herrero

Nº SOLICITUD: P202030362

Nº PUBLICACIÓN: ES 2 872 599

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 872 599**

21 Número de solicitud: 202030362

51 Int. Cl.:

A01N 63/38 (2010.01)

A01N 63/30 (2010.01)

A01N 63/20 (2010.01)

A01N 63/27 (2010.01)

A01N 63/28 (2010.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

28.04.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.11.2021

Fecha de concesión:

25.02.2022

45 Fecha de publicación de la concesión:

04.03.2022

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE LEÓN (100.0%)
Avda. de la Facultad 25
24071 León (León) ES

72 Inventor/es:

CASQUERO LUELMO, Pedro A.;
MAYO PRIETO, Sara;
RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, Álvaro;
CARRO HUERGA, Guzmán;
ÁLVAREZ GARCÍA, Samuel;
PORTEOUS ÁLVAREZ, Alejandra J. y
DEL SER HERRERO, Sara

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

54 Título: **RECUBRIMIENTO DE SEMILLA QUE COMPRENDE UN AGENTE DE BIOCONTROL Y CONOS DE LÚPULO**

57 Resumen:

Recubrimiento de semilla que comprende un agente de biocontrol y conos de lúpulo.

La presente invención es un recubrimiento de semilla que comprende un agente de biocontrol y conos de lúpulo como fuente de carbono, y opcionalmente un agente de fijación. La invención también comprende la semilla recubierta y el procedimiento de fijación.

ES 2 872 599 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de publicación internacional

WO 2021/219915 A1

(43) Fecha de publicación internacional
04 de noviembre de 2021 (04.11.2021) **WIPO | PCT**

(51) Clasificación internacional de patentes:

A01N 63/38 (2020.01) *A01N 63/27* (2020.01)
A01N 63/30 (2020.01) *A01N 63/28* (2020.01)
A01N 63/20 (2020.01)

DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2021/070288

Declaraciones según la Regla 4.17:

— sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(ii))

(22) Fecha de presentación internacional:

28 de abril de 2021 (28.04.2021)

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P202030362 28 de abril de 2020 (28.04.2020) ES

(71) Solicitante: **UNIVERSIDAD DE LEÓN** [ES/ES]; Avda. de la Facultad 25, 24071 León (ES).

(72) Inventores: **CASQUERO LUELMO, Pedro A.**; Avda. de la Facultad 25, 24071 León (ES). **MAYO PRIETO, Sara**; Avda. de la Facultad 25, 24071 León (ES). **RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, Álvaro**; Avda. de la Facultad 25, 24071 León (ES). **CARRO HUERGA, Guzmán**; Avda. de la Facultad 25, 24071 León (ES). **ÁLVAREZ GARCÍA, Samuel**; Avda. de la Facultad 25, 24071 León (ES). **PORTEOUS ÁLVAREZ, Alejandra J.**; Avda. de la Facultad 25, 24071 León (ES). **DEL SER HERRERO, Sara**; Avda. de la Facultad 25, 24071 León (ES).

(74) Mandatario: **CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel** et al.; C/ Suero de Quiñones, 34-36, 28002 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,

(54) Title: SEED COATING COMPRISING A BIOCONTROL AGENT AND HOP CONES

(54) Título: RECUBRIMIENTO DE SEMILLA QUE COMPRENDE UN AGENTE DE BIOCONTROL Y CONOS DE LÚPULO

(57) Abstract: The present invention is a seed coating comprising a biocontrol agent and hop cones as carbon source, and optionally a fixation agent. The invention also comprises the coated seed and the fixation process.

(57) Resumen: La presente invención es un recubrimiento de semilla que comprende un agente de biocontrol y conos de lúpulo como fuente de carbono, y opcionalmente un agente de fijación. La invención también comprende la semilla recubierta y el procedimiento de fijación.

WO 2021/219915 A1

DESCRIPCIÓN

**RECUBRIMIENTO DE SEMILLA QUE COMPRENDE UN AGENTE DE BIOCONTROL Y
CONOS DE LÚPULO**

5

Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo de la horticultura. En particular, al tratamiento de semillas vegetales para promover la germinación y el desarrollo de la planta en los primeros
10 estadios de crecimiento.

Antecedentes de la invención

El tratamiento de semillas utilizando recubrimientos es una práctica común en horticultura. Los recubrimientos se aplican en la superficie de la semilla para protegerla y mejorar las
15 condiciones de siembra; por ejemplo, a través del tratamiento de superficie con pesticidas para combatir enfermedades e insectos plaga, o el recubrimiento con agentes para retrasar la germinación de las semillas o para mejorar su capacidad para resistir a la sequía, calor, salinidad del suelo u otros factores externos. Otro objetivo de los recubrimientos es incrementar el peso de la semilla para facilitar su manejo.

20

Cuando el recubrimiento modifica claramente el tamaño y la forma de la semilla, el tipo de tratamiento se conoce como pildoración.

Hasta ahora el recubrimiento de semillas pildoradas ha comprendido ingredientes como arcilla
25 roja, arcilla, perlita, harina fósil, carbonato cálcico, talco, hidróxido cálcico, hidróxido de aluminio o caolín, con o sin la adición de un aglutinante. El recubrimiento de semillas pildoradas suele además comprender sustancias como nutrientes y pesticidas para favorecer el desarrollo de la semilla. En estos casos, las semillas se recubren con un agente activo triturado o en forma de mezcla en polvo, o bien disuelto en una disolución o suspensión con
30 la que se trata la superficie de las semillas.

Aunque el uso de sustancias de síntesis química suele ser eficaz y económico, presenta también grandes inconvenientes ambientales y sanitarios. Con mayor frecuencia, el consumo de alimentos está dirigido por aspectos no sólo relacionados con la seguridad del producto,
35 sino con aspectos sanitarios, nutricionales y ambientales. Se buscan por ello técnicas de producción más naturales que reduzcan el uso de sustancias de síntesis química.

Una forma sostenible a largo plazo para el control de fitopatógenos es el empleo de agentes biológicos o de biocontrol.

5 Existen formulaciones de agentes biológicos formados por bacterias como *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Bacillus*, y por hongos como *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Ampelomyces*, *Candida* y *Coniothyrium*. Sin embargo, la acción de dichos agentes de biocontrol depende de la cantidad de carbono y/o materia orgánica disponible en el medio, de la temperatura y de otros factores.

10

Los agentes de biocontrol necesitan una fuente de carbono para poder desarrollarse adecuadamente y así poder proteger a las plantas. Sin embargo, los recursos biológicos usados como fuente de carbono son finitos y extraerlos directamente del ecosistema puede resultar insostenible. Además, los agentes de biocontrol pueden responder de forma distinta a diferentes fuentes de carbono, sobre todo cuando son parte de mezclas complejas de material orgánico. Es posible además que la fuente de carbono interfiera con el crecimiento de la planta.

15

La solicitud EP 1051075 A2 describe un agente protector de las plantas basado en una preparación de distintas plantas. La EP 0538091 A1 emplea compuestos extraídos de algas marinas para recubrir la semilla. La solicitud WO 03071855 A2 describe una semilla recubierta con un polvo fino seco de un micronutriente mezclado con un agente dispersante. Ninguno de estos documentos describe ni sugiere el uso de agentes de biocontrol.

20

La patente CN 103039439 B sí incorpora *Trichoderma*, que es un hongo beneficioso para las plantas utilizado como agente de control biológico contra diversos patógenos vegetales. La composición incluye polietilenglicol y un adhesivo para formar el recubrimiento, sin embargo no utiliza ningún sustrato orgánico.

25

La solicitud WO 1991007869 A1 se considera como el documento más cercado de la técnica. Describe una semilla recubierta con *Trichoderma* y un material particulado carbonáceo, en particular, turba, esquistos lignosos, lignita de *Sphagnum*, carbón activado o mezclas de los mismos. Sin embargo, estos componentes de suelos húmicos no resultan los más adecuados como fuente de carbono para *Trichoderma* o para cualquier otro agente de biocontrol.

30

35

Por otra parte, el lúpulo, *Humulus lupulus*, es una planta de la que se aprovechan las flores, también conocidas como “conos”, para la industria cervecera y farmacéutica. Solo los conos de las flores femeninas pueden secretar lupulina que es donde se acumulan los principales principios activos del lúpulo. En el mejor conocimiento de los inventores nunca se ha descrito el uso de conos de lúpulo como fuente de carbono de un agente de biocontrol.

El problema de la técnica puede plantearse como la obtención de una fuente de carbono de mejor disponibilidad para un agente de biocontrol en un recubrimiento de semilla. La solución de la presente invención es el uso de conos de lúpulo en dicho recubrimiento.

10 **Descripción**

La presente invención se refiere a un recubrimiento de semillas que comprende al menos un agente de biocontrol y conos de lúpulo como fuente de carbono. Dicho recubrimiento promueve el crecimiento del agente de biocontrol y mejora las características de crecimiento de la planta.

15 En la presente invención, se entiende por “agente de biocontrol” o agente biológico un microorganismo con capacidad para reducir la población de un eventual agente patógeno o para evitar sus efectos.

20 El recubrimiento de semillas de la presente invención puede encontrarse en una cantidad de 3 a 200 kg por cada kg de semilla, es decir, en un porcentaje en peso de 300 a 2.000%, con respecto al peso de la semilla. Por tanto, el recubrimiento de la presente invención se considera un tipo de pildorado de semillas. La cantidad de recubrimiento varía en función del tamaño y forma de la semilla en el mejor conocimiento del experto.

25 En la presente invención se entiende por “conos de lúpulo”, la flor femenina de la planta *Humulus lupulus*, ya sea la flor entera o cualquier parte o combinación de partes la misma, o bien polvo de conos de lúpulo.

30 Los conos de lúpulo de la invención tienen un tamaño de partícula que puede variar según la superficie a recubrir, pero en un aspecto preferible será menor de 500 µm.

En otro aspecto preferible, el recubrimiento de la presente invención comprende polvo de conos de lúpulo, más preferiblemente con un tamaño de partícula entre 150 y 500 µm. El polvo de conos de lúpulo es obtenible por trituración, molienda, o cualquier método conocido en la técnica para la formación de polvos.

En otro aspecto de la invención, los conos de lúpulo se utilizan en el recubrimiento en forma seca.

- 5 Los conos de lúpulo a utilizar en el recubrimiento de la presente invención pueden provenir de cualquier fuente, por ejemplo, directamente de la cosecha de la planta, de restos de cosecha de la planta o de desechos o subproductos de la industria.

10 Los conos de lúpulo pueden representar entre el 5 y 99,5% en peso del peso total del recubrimiento. Por ejemplo, los conos de lúpulo pueden encontrarse en una cantidad de 5% a 10%, de 10% a 20%, de 20% a 30%, de 30% a 40%, de 40% a 50%, de 50% a 60%, de 70% a 80%, de 80% a 90%, o de 90% a 99,5%, en peso, con base en el peso total del recubrimiento. El porcentaje de conos de lúpulo a utilizar varía de acuerdo con el tamaño de la semilla; por ejemplo, puede ser de entre 60% y 90% para semillas pequeñas, de 20% y 15 60% para semillas medianas, y de entre 5% y 20% para semillas grandes, con respecto al peso de las semillas.

De acuerdo con la presente invención, el recubrimiento de la semilla comprende al menos un agente de biocontrol. En un aspecto preferible, el agente de control biológico es una bacteria. 20 En otro aspecto es un hongo que forma esporas. Preferiblemente, el agente de biocontrol tiene la capacidad de colonizar el sistema de raíces de la planta a la cual se aplica. Más preferiblemente, los agentes de biocontrol se seleccionan entre al menos una bacteria del género de *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* o *Bacillus*, y al menos un hongo del género *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Ampelomyces*, *Candida* o *Coniothyrium*. Es posible utilizar 25 combinaciones de dos o más agentes de biocontrol conforme a la presente invención. En un aspecto preferido, el agente de biocontrol es *Trichoderma spp.*, y preferiblemente se selecciona de *T. harzianum*, *T. velutinum*, o combinaciones de los mismos.

La concentración de agente de biocontrol en el recubrimiento varía de acuerdo con factores 30 como el tipo, propiedades y dimensiones de la semilla. El agente de biocontrol debe estar en una cantidad suficiente para proporcionar un efecto protector o promotor del crecimiento. UN aspecto preferible de la invención es utilizar de 10^5 a 10^{10} unidades formadoras de colonia (CFU) por gramo de peso de la semilla.

35 En otro aspecto preferible, el recubrimiento de semillas comprende además al menos un agente de fijación. El agente de fijación puede necesitarse para fijar el agente de biocontrol y

los conos de lúpulo a la superficie de la semilla. En la presente invención se puede utilizar cualquier tipo de agente de fijación siempre que no sea dañino para la semilla o el agente de biocontrol. Por esta razón, un aspecto muy preferible es un agente de fijación acuoso. En otro aspecto más preferible, el agente de fijación está presente en una cantidad de entre 0,5 y 90%
5 en peso con base en el peso total del recubrimiento.

El agente de fijación se puede seleccionar de una sustancia seleccionada de melaza, azúcar granulada, alginatos, goma guar, goma arábica, goma xantana, goma karaya, mucílago, o combinaciones de los mismos. En otro aspecto, el agente de fijación puede además
10 comprender acetatos de polivinilo, copolímeros de acetato de polivinilo, alcoholes polivinílicos, copolímeros de alcohol de polivinilo, celulosas, incluyendo etilcelulosas y metilcelulosas, celulosas hidroximetilo, hidroxipropilcelulosas, hidroximetilpropil-celulosas, polivinilpirrolidonas, dextrinas, maltodextrinas, polisacáridos, grasas, aceites, proteínas, gomas lacas, copolímeros de cloruro de vinilideno, copolímeros de cloruro de vinilideno,
15 lignosulfonatos de calcio, copolímeros acrílicos, almidones, polivinilacrilatos, zeínas, gelatina, carboximetilcelulosa, quitosano, óxido de polietileno, polímeros y copolímeros de acrilamida, acrilato de polihidroxietilo, metilacrilimida, monómeros de etilceno, alúmina, alginatos, poliácido de metilo, polímeros y copolímeros de acetato de vinilo, metilcelulosa, celulosa, polivinilpirrolidona, o combinaciones de los mismos.

20 En otro aspecto preferible, la composición de recubrimiento consiste en un agente de biocontrol y conos de lúpulo como fuente de hidratos de carbono. En otro aspecto más preferible, incluye además un agente de fijación.

25 Los conos de lúpulo presentan la ventaja técnica de proporcionar un mayor crecimiento del agente de biocontrol y, por tanto, de mejorar de las características de crecimiento de la semilla y proteger contra fitopatógenos, con respecto a la turba.

La presente invención es útil para mejorar las características de crecimiento de las semillas, promover la germinación y el desarrollo de la planta en los primeros estadios de crecimiento
30 y proteger cultivos agrícolas frente a daños de enfermedades y plagas. Debido a que el recubrimiento y las semillas recubiertas conforme a la presente invención se pueden valer únicamente de agentes de biocontrol y lúpulo como sustrato, tienen la ventaja de que evita la utilización de compuestos de síntesis química.

35

Más aún, la invención aprovecha el potencial del lúpulo, pues la industria genera una cantidad importante de desechos de conos de lúpulo. De este modo, la presente invención representa una alternativa ecológica y sostenible para mejorar el crecimiento de las semillas y proteger los cultivos agrícolas.

5

En otro aspecto preferible más, el recubrimiento de la presente invención incluye un relleno de bentonita, caolín, arcilla, talco, perlita, sílices, polvo de cuarzo, montmorillonita, carbón activado, carbohidratos, almidones, harinas, tierra de diatomeas, o combinaciones de los mismos.

10

La presente invención también se refiere a una semilla recubierta con el recubrimiento de semillas descrito. Por tanto, otro aspecto preferible más es una semilla recubierta, cuyo recubrimiento comprende conos de lúpulo y al menos un agente de biocontrol.

15

La semilla de la presente invención puede ser cualquier semilla vegetal sin importar su forma o tamaño. Preferiblemente, la semilla en cuestión pertenece a una planta de interés agronómico, por ejemplo una planta hortícola como tomate, calabacín o pimiento; una planta forrajera como alfalfa o trébol; un cereal como avena, maíz o trigo; una leguminosa como soja, judía, guisante o altramuza, una planta oleaginosa como colza o girasol, una planta de aprovechamiento industrial como algodón, remolacha o tabaco, o de cualquier planta ornamental o silvestre.

20

En otro aspecto preferible, la semilla a recubrir tiene un tamaño de 1 a 20 mm. En otro aspecto más, es una semilla pequeña, con un tamaño menor a 3 mm, tal como una semilla de brócoli, colza o alfalfa. En otro aspecto más, la semilla a recubrir es una semilla mediana, que tiene un tamaño de 3 mm hasta 10 mm, tal como una semilla de lenteja o trigo. En otro aspecto más, es una semilla grande, con un tamaño mayor que 10 mm, tal como una semilla de maíz, judía, garbanzo, girasol o melón.

25

30

Un aspecto preferible de la presente invención es una semilla recubierta en al menos un 50% de su superficie, preferiblemente en al menos el 80% o en al menos el 90% de la superficie de las semillas, lo más preferible recubierta en el 100% de su superficie.

35

Otra realización preferible más es un método de recubrimiento de una semilla con el recubrimiento de la invención. Para recubrir la semilla es necesario poner en contacto los componentes del recubrimiento de semillas con la superficie de la semilla. Para fijar el agente

de biocontrol y los conos de lúpulo a la superficie de la semilla puede necesitarse un agente de fijación. La puesta en contacto de cada uno de los componentes del recubrimiento de semillas, incluyendo lúpulo, agente de biocontrol, y, en su caso, agente de fijación y/o cualquier otro componente opcional o adicional, puede ocurrir simultánea o secuencialmente.

5

En un aspecto preferible más, el recubrimiento de las semillas se realiza en una sola etapa, poniéndola en contacto con una mezcla de todos los componentes del recubrimiento de la invención. También es posible añadir secuencialmente los componentes del recubrimiento hasta formar la semilla recubierta de la presente invención. Por ejemplo, tratándose de un recubrimiento de la invención que utiliza agente de fijación, el método puede realizarse en dos etapas: primero, se pone en contacto con la superficie de las semillas una mezcla de agente de fijación y ya sea el agente de biocontrol o los conos de lúpulo; y posteriormente, se pone en contacto la semilla con el componente restante. En un aspecto adicional, la puesta en contacto se acompaña de agitación mecánica con el fin de mejorar la eficiencia y/o velocidad del recubrimiento.

15

El método de la presente invención puede comprender, además, una etapa de secado de la semilla recubierta, con el fin de promover o acelerar la fijación del recubrimiento y la manipulación de las semillas recubiertas.

20

El recubrimiento de las semillas puede llevarse a cabo en cualquier aparato adecuado para el tratamiento de las mismas, incluyendo en una mezcladora concreta o un tambor rotatorio o lecho fluidizado. El recubrimiento se puede realizar por lotes o en un proceso continuo.

25 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Desarrollo de aislamientos del agente de biocontrol *Trichoderma spp.* en restos de cosecha de lúpulo.

Se estudió el efecto que tienen los restos de cosecha de lúpulo en el desarrollo de un agente de biocontrol de la especie *Trichoderma spp.* Para ello se emplearon dos aislamientos de *T. harzianum* y uno de *T. velutinum* que han demostrado su capacidad de biocontrol. que se identificaron con los nombres de *T. harzianum* T019, *T. harzianum* T059 y *T. velutinum* T029. Como sustratos, se utilizó hojas y conos de lúpulo.

30

Se molieron todos los sustratos hasta obtener un tamaño de partícula inferior a 500 µm, y se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 min para eliminar cualquier organismo que pudieran tener. En placas Petri de 60 mm de diámetro se pesaron 5 g de cada sustrato. Se

35

añadieron 5 ml de agua destilada autoclavada a 121°C 20 min. Se preparó una solución de esporas de *T. harzianum* y otra de *T. velutinum*, cada una con una concentración de 2×10^7 esporas/ml y se añadió 1 ml de esa solución a cada placa Petri. Se sellaron las placas con Parafilm y se incubaron durante 15 días a 25 °C. Se hicieron 3 repeticiones por tratamiento.

5 Trascurrido este periodo se conservaron a -80°C hasta su procesado.

Para la obtención de la cantidad de *Trichoderma* desarrollado en los sustratos se extrajo el ADN de cada placa con FavorPrep Soil DNA Isolation Kit (Favorgen Biotech Corporation) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó qPCR de cada extracción usando Step One Plus™ (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se empleó el gen α -actina como referencia para el análisis.

Tabla 1. Concentración de ADN obtenida en los distintos sustratos.

Sustrato	Concentración ADN ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	<i>T. harzianum</i> T019	<i>T. harzianum</i> T059	<i>T. velutinum</i> T029
Restos de hojas	5,274	10,947	0,003
Conos o flores	3.358,989	73,386	2,492

15 Los resultados, mostrados en la Tabla 1, muestran que los conos de lúpulo en donde ha estado desarrollándose los aislamientos de *Trichoderma* es mucho mayor en conos de lúpulo que en restos de hojas. Con estos resultados se demuestra que los conos de lúpulo promueven el desarrollo de los agentes de biocontrol.

20 **Ejemplo 2: Desarrollo de aislamientos del agente de biocontrol *Trichoderma spp.* en turba**

Se cultivó *Trichoderma* bajo las mismas condiciones del Ejemplo 1, pero utilizando turba y turba con harina de maíz como sustratos. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

25 Tabla 2. Concentración de ADN obtenida en turba y turba con harina de maíz.

Sustrato	Concentración de ADN ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
	<i>Trichoderma</i> T019
Turba	90,14
Turba + harina de maíz	29,23

En consecuencia, el uso de conos o flores de lúpulo para el desarrollo de *Trichoderma* spp. ha sido muy superior en comparación con la turba o la turba con harina de maíz.

5 **Ejemplo 3: Efecto del pildorado de semillas con lúpulo en la germinación**

Se emplearon distintos tipos de semillas para la evaluación del pildorado. Se pretendió comprobar el efecto del pildorado realizado antes de la siembra en la germinación. Por ello se evaluaron semillas de distintas formas y tamaños:

- 10 - Semillas pequeñas, < 3 mm: brócoli, colza, alfalfa
- Semillas medianas, 3 – 10 mm: lenteja, trigo
- Semillas grandes, > 10 mm: maíz, judía, garbanzo, girasol, melón

Se realizó una prueba de germinación en el laboratorio. Las semillas se desinfectaron con un ciclo de limpieza de 20 minutos en solución de hipoclorito de sodio al 10% y 3 lavados en agua destilada autoclavada para destruir los patógenos presentes en la cubierta de la semilla y evitar el crecimiento de hongos. Las semillas se dejaron secar en campana de flujo laminar durante 20 min.

20 Posteriormente se realizó el pildorado siguiendo el siguiente procedimiento: 1) las semillas a recubrir se colocaron en un aparato adecuado para el recubrimiento de semillas; 2) se añadió un porcentaje del peso de las semillas de un agente de fijación, que incluye goma arábiga; 3) se agitó hasta que las semillas quedaron recubiertas; 4) se añadió un porcentaje del peso de las semillas del polvo de conos de lúpulo, *H. lupulus*; 5) se agitó hasta que las semillas
25 quedaron recubiertas.

Para semillas pequeñas (< 3 mm), se utilizó 60 % de *S. muticum* y 30% de agente de fijación del peso de semillas. Para semillas medianas (3-10 mm), 20 % de *S. muticum* y 15% de agente de fijación del peso de semillas. Para semillas grandes (> 10 mm), 7% de *S. muticum*
30 y 3% de agente de fijación del peso de semillas.

Posteriormente, se recogieron las semillas y se dejaron secar para su manipulación. Como control, se utilizó la semilla sin pildorar.

35 Se realizaron 3 repeticiones de 10 semillas para melón y 20 semillas para el resto, de tamaño similar sin daño observable, que se distribuyeron homogéneamente en placas de Petri (80-

100 mm de diámetro en función del tamaño de la semilla) sobre dos papeles de filtro añadiendo 1-15 ml de agua destilada autoclavada según el tipo de semilla. Las placas se sellaron con Parafilm para evitar pérdidas de humedad y se mantuvieron en la oscuridad durante 12 días a 22 ± 1 °C, revisando la germinación diariamente.

- 5 Se consideró que las semillas estaban germinadas cuando las radículas tenían más de 3 mm. Se tomaron los datos de germinación de la semilla (porcentaje del número de semillas agregadas), la longitud de la raíz de las plántulas emergidas, así como el peso fresco de las radículas emergidas se midió cuando se había alcanzado el 95 % de las semillas germinadas o bien durante 3 días consecutivos no se habían producido nuevas germinaciones. También
- 10 se calcularon los siguientes índices:

$$(1) \text{ Germinación relativa (\%)} = \frac{\text{Semillas germinadas (tratamiento)}}{\text{Semillas germinadas (control)}} \times 100$$

$$(2) \text{ Biomasa relativa (\%)} = \frac{\text{Peso fresco medio (tratamiento)}}{\text{Peso fresco medio (control)}} \times 100$$

$$(3) \text{ Longitud relativa raíz (\%)} = \frac{\text{Longitud media raíz (tratamiento)}}{\text{Longitud media raíz (control)}} \times 100$$

$$(4) \text{ Índice germinación} = \frac{\text{Germinación (Tratamiento)}}{\text{Germinación (control)}} \times \frac{\text{Longitud raíz (tratamiento)}}{\text{Longitud raíz (control)}} \times 100$$

Los resultados se muestran en la Tabla 3.

15 *Tabla 3. Germinación de las distintas semillas recubiertas con lúpulo y sus controles cuando han sido pildoradas y sembradas en el mismo día.*

Semilla	Germinación (%)	GR ¹ (%)	Biomasa (mg)	BR ² (%)	Longitud raíz (mm)	LRR ³ (%)	IG ⁴
Tamaño pequeño							
Alfalfa	C	58,33 ± 3,33 a		2,49 ± 0,14 a	24,72 ± 1,81		
	T ⁵	61,67 ± 10,93 a	105,71	2,86 ± 0,17 a	33,14 ± 2,82	134,05	141,71
Brócoli	C	65,00 ± 5,00 a		3,67 ± 0,23 b	36,73 ± 3,03		
	T	28,33 ± 3,33 b	43,59	9,89 ± 3,53 a	17,52 ± 2,93	47,70	43,59
Colza	C	90,00 ± 10,00 a		4,13 ± 0,24 a	54,79 ± 3,93		
	T	50,00 ± 2,89 b	55,56	4,03 ± 0,26 a	42,55 ± 4,07	77,65	55,56

ES 2 872 599 B2

Lenteja	C	88,33 ± 4,41 a		7,47 ± 0,13 a		13,60 ± 0,61		
	T	83,33 ± 7,26 a	94,34	7,41 ± 0,17 a	99,17	11,55 ± 0,54	84,94	94,34
<hr/>								
Trigo	C	100,00 ± 0,00		7,29 ± 0,16 a		17,43 ± 0,63		
	T	96,67 ± 1,67 a	96,67	6,68 ± 0,16 b	91,64	14,91 ± 0,86	85,54	96,67
<hr/>								
Tamaño grande								
Garbanzo	C	98,33 ± 1,67 a		74,84 ± 0,78		13,96 ± 0,67		
	T	76,67 ± 3,33 b	77,97	73,07 ± 0,77	97,64	5,23 ± 0,28 b	37,49	77,97
<hr/>								
Girasol	C	95,00 ± 0,00 a		17,91 ± 0,32		21,16 ± 1,02		
	T	81,67 ± 6,01 a	85,96	17,71 ± 0,40	98,92	14,14 ± 1,27	66,82	85,96
<hr/>								
Judía	C	98,33 ± 1,67 a		114,72 ± 2,63 a		43,07 ± 3,44		
	T	93,33 ± 3,33 a	94,92	113,72 ± 2,80 a	99,13	31,67 ± 2,59	73,53	94,92
<hr/>								
Maíz	C	95,00 ± 0,00 a		48,80 ± 0,96		21,12 ± 1,40		
	T	90,00 ± 2,89 a	94,74	48,83 ± 1,13	100,07	17,15 ± 1,38	81,19	94,74
<hr/>								
Melón	C	73,33 ± 14,53		12,68 ± 0,53		41,77 ± 4,50		
	T	40,00 ± 5,77 a	54,55	14,99 ± 0,66	118,19	58,39 ± 5,75	139,81	54,55
<hr/>								

¹ Germinación relativa

² Biomasa relativa

³ Longitud relativa de la raíz

⁴ Índice de germinación

⁵ Control

⁶ Tratamiento con lúpulo

Observando los resultados, la germinación no fue inhibida en la mayoría de las semillas, a excepción de brócoli, colza y melón que hubo una menor germinación respecto al control. En cuanto a la producción de biomasa, ninguna semilla presentó una reducción, destacando el

brócoli en que el desarrollo fue mayor respecto al control. En cuanto a la longitud de la radícula, la aplicación del pildorado causó en algunas semillas que se incrementara como en el caso de la alfalfa y el melón. En cuanto al índice de germinación las semillas presentaron unos valores altos a excepción de brócoli y melón, que fueron bajos.

5
Con estos resultados se demuestra que los conos de lúpulo no resultan un agente inhibidor de la germinación de las semillas que han sido pildoradas y sembradas en el mismo día, llegando incluso a favorecerla en algunas de ellas.

10 **Ejemplo 4: Efecto del pildorado de semillas con polvo de conos de lúpulo en la germinación trascurrido un mes desde el pildorado**

Se emplearon distintos tipos de semillas para la evaluación del pildorado realizado con un mes de antelación a la siembra, teniendo en cuenta su forma y tamaño. Se pretendió comprobar el efecto del pildorado realizado mucho tiempo antes de la siembra por si pudiera endurecerse e impedir la germinación. Por ello se evaluaron semillas de la misma variedad
15 de tamaños usada en el Ejemplo 3.

Se realizó una prueba de germinación en el laboratorio. Las semillas se desinfectaron con un ciclo de limpieza de 20 minutos en solución de hipoclorito de sodio al 10% y 3 lavados en agua
20 destilada autoclavada para destruir los patógenos presentes en la cubierta de la semilla y evitar el crecimiento de hongos. Las semillas se dejaron secar en campana de flujo laminar durante 20 minutos. Posteriormente se realizó el pildorado siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 3.

25 Se realizaron 3 repeticiones de 10 semillas, de tamaño similar sin daño observable que se distribuyeron homogéneamente en placas de Petri (80-100 mm de diámetro en función del tamaño de la semilla) sobre dos papeles de filtro añadiendo 1-15 ml según el tipo de semillas agua destilada autoclavada. Las placas se sellaron con Parafilm para evitar pérdidas de humedad y se mantuvieron en la oscuridad durante 12 días a 22 ± 1 °C, comprobando la
30 germinación diariamente.

Se consideró que las semillas estaban germinadas cuando las radículas tenían más de 3 mm. Se tomaron los datos de germinación de la semilla (porcentaje del número de semillas agregadas), la longitud de la raíz de las plántulas emergidas, así como el peso fresco de las radículas emergidas se midió cuando se había alcanzado el 95 % de las semillas germinadas
35 o bien durante 3 días consecutivos no se habían producido nuevas germinaciones. También

se calcularon los índices de germinación relativa (%), biomasa relativa (%), longitud relativa raíz (%) e índice germinación (%) conforme se indica en el Ejemplo 3.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

5 *Tabla 4: Germinación de las distintas semillas recubiertas con lúpulo y sus controles cuando han sido pildoradas y sembradas un mes tras el recubrimiento.*

Semilla		Germinación (%)	GR ¹ (%)	Biomasa (mg)	BR ² (%)	Longitud raíz (mm)	LRR ³ (%)	IG ⁴
Tamaño pequeño								
Alfalfa	C ⁵	36,67 ± 8,82 a	145,45	4,71 ± 0,69 a	67,25	45,94 ± 6,97 a	98,19	142,82
	T ⁶	53,33 ± 16,67 a		3,17 ± 0,36 b		45,11 ± 5,97 a		
Brócoli	C	73,33 ± 6,67 a	90,91	3,05 ± 0,37 a	82,32	28,44 ± 5,52 a	95,57	86,89
	T	66,67 ± 6,67 a		2,51 ± 0,35 a		27,18 ± 4,76 a		
Colza	C	63,33 ± 17,64 a	68,42	3,21 ± 0,37 a	87,05	56,98 ± 13,76 a	112,6	77,06
	T	43,33 ± 8,82 a		2,80 ± 0,46 a		64,17 ± 13,93 a		
Tamaño medio								
Lenteja	C	79,26 ± 0,74 a	113,55	10,73 ± 0,39 a	88,28	18,69 ± 1,45 a	71,10	80,73
	T	90,00 ± 10,00 a		9,47 ± 0,32 b		13,29 ± 1,00 b		
Trigo	C	93,33 ± 3,33 a	100,00	9,88 ± 0,41 a	93,73	22,97 ± 1,63 a	101,0	101,08
	T	93,33 ± 3,33 a		9,26 ± 0,31 a		23,22 ± 1,29 a		
Tamaño grande								
Garbanzo	C	83,33 ± 3,33 b	120,00	86,34 ± 1,90 a	94,42	14,44 ± 1,77 a	88,66	106,39
	T	100,00 ± 0,00 a		81,52 ± 1,24 b		12,80 ± 1,27 a		
Girasol	C	80,00 ± 10,00 a	66,67	34,14 ± 1,21 a	108,34	28,03 ± 2,57 a	135,7	90,53
	T	53,33 ± 12,02 a		36,99 ± 3,93 a		38,06 ± 6,13 a		
Judía	C	93,33 ± 3,33 a	85,71	113,64 ± 7,00 a	104,12	25,13 ± 3,41 a	82,13	70,39
	T	80,00 ± 0,00 b		118,32 ± 5,97 a		20,64 ± 2,40 a		
Maíz	C	100,00 ± 0,00 a	90,00	52,46 ± 1,27 a	104,12	29,91 ± 2,47 a	68,11	61,29
	T	90,00 ± 5,77 a		54,62 ± 1,55 a		20,37 ± 1,89 b		
Melón	C	20,00 ± 10,00 b	250,00	24,12 ± 0,91 a	74,77	28,74 ± 7,90 b	172,5	431,40
	T	50,00 ± 0,00 a		18,04 ± 1,05 b		49,59 ± 4,47 a		

¹ Germinación relativa

² Biomasa relativa

³ Longitud relativa de la raíz

⁴ Índice de germinación

⁵ Control

⁶ Tratamiento con lúpulo

Analizando la germinación, el pildorado con lúpulo no inhibió la germinación en las semillas de estudio, siendo favorecida significativamente en el caso del garbanzo y el melón. En cuanto

a la biomasa, fue algo inferior en algunas semillas como alfalfa, lenteja y melón, pero en el resto, no se produjo ninguna reducción de la misma. En el caso de la longitud de la raíz, las semillas no presentaron una disminución del desarrollo radicular, a excepción de lenteja, maíz y melón. En el caso del índice de germinación, cabe destacar la semilla de melón que se produjo un incremento notable en dicho valor.

Con estos resultados se demuestra que los conos de lúpulo no resultan un agente inhibidor del crecimiento de la planta a partir de semillas que han sido pildoradas y sembradas en el mismo día, llegando incluso a favorecerla en algunas de ellas.

Ejemplo 5: Efecto del pildorado de semillas con el agente de biocontrol *Trichoderma* y con polvo de conos de lúpulo en la germinación

Se emplearon distintos tipos de semillas para la evaluación del pildorado, teniendo en cuenta su forma y tamaño. Se pretendió comprobar el efecto del pildorado realizado antes de la siembra en la germinación. Por ello se evaluaron las siguientes semillas: semilla pequeña (< 3 mm): colza; semilla mediana 3 – 10 mm: trigo; semilla grande (>10 mm): judía.

Las semillas se desinfectaron con un ciclo de limpieza de 20 minutos en solución de hipoclorito de sodio al 10% y 3 lavados en agua destilada autoclavada para destruir los patógenos presentes en la cubierta de la semilla y evitar el crecimiento de hongos. Las semillas se dejaron secar en campana de flujo laminar durante 20 min. Posteriormente las semillas se impregnaron con una solución formada por 75 % v/v de agente de fijación y 25 % v/v solución de esporas de *Trichoderma* ($8 \cdot 10^7$ esporas/ml). Después fueron recubiertas con polvo de conos de lúpulo. Las semillas control no tenían recubrimiento.

Se realizaron 3 repeticiones de 10 semillas, de tamaño similar sin daño observable que se distribuyeron homogéneamente en macetas de polipropileno de 250 ml de capacidad con sustrato (80% turba rubia, 20% turba negra y pH 5.5). Se regaron cada maceta previamente a la siembra hasta que llegó a capacidad de campo. Se mantuvieron en cámara de cultivo a 22 ± 1 °C y se regaron cada 2 días con 25 ml de agua.

Se consideró que las semillas estaban germinadas cuando las radículas tenían más de 3 mm. Se tomaron los datos de germinación de la semilla (porcentaje del número de semillas agregadas), la longitud de la raíz de las plántulas emergidas, así como el peso fresco de las radículas emergidas se midió cuando se había alcanzado el 95 % de las semillas germinadas o bien durante 3 días consecutivos no se habían producido nuevas germinaciones. También

se calcularon los índices de germinación relativa (%), biomasa relativa (%), longitud relativa raíz (%) e índice de germinación, conforme se indica en el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

5 *Tabla 5. Germinación de las distintas semillas recubiertas con lúpulo y el agente de biocontrol.*

Semilla	Germinación	GR ¹ (%)	Biomasa (mg)	BR ² (%)	Longitud raíz	LRR ³ (%)	IG ⁴
Tamaño pequeño							
Colza	C	23,33 ± 3,33 a	271, 43	34,76 ± 7,53 a	99,47	46,11 ± 9,00 a	176,0 4
	T ⁶	63,33 ± 17,64 a		34,57 ± 10,27 a		29,91 ± 9,38 a	
Trigo	C	23,33 ± 12,02 b	414, 29	130,84 ± 12,55 b	159,4 7	100,43 ± 8,07 b	157,2 1
	T	96,67 ± 3,33 a		208,65 ± 9,99 a		157,89 ± 3,14 a	
Judía	C	90,00 ± 10,00 a	103, 70	1.990,51 ± 136,04 b	152,6 1	117,93 ± 8,19 b	137,0 4
	T	93,33 ± 3,33 a		3.037,73 ± 158,27 a		161,62 ± 4,20 a	

¹ Germinación relativa

² Biomasa relativa

³ Longitud relativa raíz

⁴ Índice de germinación

⁵ Control

⁶ Tratamiento con restos de lúpulo y *Trichoderma* sp.

Observando los resultados del efecto del pildorado de semillas con el agente de biocontrol *Trichoderma* y lúpulo en las tres semillas de estudio, la germinación presentó unos valores muy altos en las tres semillas, destacando el trigo con un valor superior al 600 %, al igual que la producción de biomasa y en la longitud del sistema radicular.

Con estos resultados se demuestra que los conos de lúpulo en combinación con un agente de biocontrol favorecen el desarrollo de las semillas respecto al control.

REIVINDICACIONES

1. Un recubrimiento de semilla caracterizado por que comprende al menos un agente de biocontrol y conos de lúpulo como fuente de carbono.
5
2. El recubrimiento de semilla según la reivindicación 1, caracterizado por que dichos conos de lúpulo son conos de lúpulo en polvo.
3. El recubrimiento de semilla según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que dichos
10 conos de lúpulo están presentes en una cantidad del 5 al 99,5% en peso respecto al peso total del recubrimiento.
4. El recubrimiento de semilla según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el al menos un agente de biocontrol es una bacteria o un hongo,
15 o mezclas de los mismos.
5. El recubrimiento de semilla según la reivindicación 4, caracterizado por que dicha bacteria se selecciona del grupo que consiste en *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Bacillus*.
20
6. El recubrimiento de semilla según la reivindicación 4, caracterizado por que dicho hongo se selecciona del grupo que consiste en *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Ampelomyces*, *Candida* y *Coniothyrium*.
7. El recubrimiento de semilla según la reivindicación 6, caracterizado por que dicho
25 hongo es *Trichoderma* spp.
8. El recubrimiento de semilla según la reivindicación 7, caracterizado por que dicho hongo es *T. harzianum* y/o *T. velutinum*.
30
9. El recubrimiento de semilla según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que el al menos un agente de biocontrol está presente en una cantidad de 10^5 a 10^{10} CFU por gramo de peso de la semilla.
- 35 10. El recubrimiento de semilla según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que comprende al menos un agente de fijación.

11. Una semilla caracterizada por que presenta un recubrimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 5 12. La semilla según la reivindicación 11, caracterizada porque dicho recubrimiento cubre al menos el 50%, o al menos el 80% o al menos el 90%, o el 100% de la superficie de dicha semilla.
- 10 13. La semilla según la reivindicación 11 o 12, caracterizada por que dicha semilla es de una planta seleccionada del grupo que consiste en brócoli, colza, alfalfa, lenteja, trigo, maíz, judía, garbanzo, girasol, melón, tomate, calabacín, pimiento, trébol, avena, soja, guisante, altramuza, algodón, remolacha y tabaco.
- 15 14. Un método de recubrimiento de una semilla, caracterizado porque comprende poner en contacto conos de lúpulo y al menos un agente de biocontrol con la superficie de dicha semilla.
- 20 15. El método según la reivindicación 14, caracterizado porque dichos conos de lúpulo y dicho al menos un agente de biocontrol se ponen en contacto con la superficie de la semilla de forma secuencial.

20



Discusión



Discusión

La presente tesis pretende mejorar la sostenibilidad del cultivo del lúpulo y buscar nuevas aplicaciones que mejoren la sanidad del cultivo y fomenten la bioeconomía circular de sus subproductos.

Evaluación de materias activas y nanotransportadores para el control sostenible de oídio en lúpulo

Una de las enfermedades comunes en lúpulo es el oídio causado por *Podosphaera macularis*. En los últimos años, en España, es la enfermedad que más problemas ha presentado a la hora de su manejo. Se han retirado muchos de los productos fitosanitarios autorizados para su control en el Registro de Productos fitosanitarios (MAPA, 2023). Actualmente, para la campaña de lúpulo de 2023 hay cinco materias activas autorizadas, hidrogenocarbonato de potasio, azufre, aceite de naranja, *Bacillus anyloliquefaciens* subsp. *plantarum* D747 y la combinación de los aceites esenciales Eugenol, Geraniol y Timol. Hasta 2022 se podía emplear el producto de síntesis química metrafenona, que controlaba la enfermedad de manera eficaz. Durante la campaña de 2020 se llevaron a cabo ensayos para evaluar en campo estrategias sostenibles en el control de enfermedades de lúpulo. Se estudiaron distintas alternativas sostenibles autorizadas para el control de *P. macularis*, con el fin de evaluarlas en comparación con los productos de síntesis química autorizados en el momento. Se evaluaron alternativas sostenibles como productos de residuo cero, agentes de control biológico (BCA), productos fitosanitarios permitidos en agricultura ecológica como el azufre y nanotransportadores.

El uso de nanotransportadores en agricultura puede tener beneficios agroambientales ya que es una tecnología biocompatible que mejora el transporte de compuestos dentro de la planta. Una de las ventajas principales es la posibilidad de reducir la dosis de producto fitosanitario en los tratamientos, ya que se aumenta la eficiencia de su transporte (Wang *et al.*, 2022). En este trabajo se utilizó el nanotransportador Nutragreen® para evaluar cómo influía en la reducción de dosis de aplicación en aquellos tratamientos con productos fitosanitarios de síntesis química. En la Tabla 2 se especifican los tratamientos aplicados. En los ensayos se evaluó la incidencia de la enfermedad en hoja y tras la cosecha su incidencia en los conos y rendimiento.

Por lo general, se observó que, a mayor incidencia de la enfermedad en conos y hojas, el índice de cosecha y el contenido en α -ácidos se redujeron. En mayor o menor medida, todos los tratamientos controlaron la incidencia de la enfermedad en hoja, en comparación con las plantas no tratadas. Por el contrario, la enfermedad no se controló con tanta eficacia en los conos. Los tratamientos con productos fitosanitarios de síntesis química fueron más eficaces que los tratamientos con productos de residuo cero y control biológico. Los tratamientos con el nanotransportador Nutragreen® y una reducción de dosis del 30% resultaron ser un control eficiente de la enfermedad.

Tabla 2 Lista de tratamientos, nombre comercial del producto y materia activa aplicados en los ensayos de campo para el control de *Podospheara macularis* descritos en el Capítulo 1

Tratamiento	Nombre del producto	Materia activa
ECO	LECTUM	Lecitina de soja (No-OGM) + Extracto de <i>Equisetum arvense</i> [EC] W/W
AGR	ACTILEAF HELIOSUFRE VITISAN	Cerevisane 94,1% [WP] W/W Azufre 72% [+ Pinolene] [SC] W/V Hidrogenocarbonato de potasio 99,99% [SP] W/W
IDA	NELA S-SYSTEM	Extracto de canela [EC] W/W Azufre bioasimilable 32% + Mn + Zn [EC] W/W
SIP	ARAW	Eugenol 3,3% + Geraniol y Timol 6,6% [CS] W/V
CER	ARMICARB AMYLO-X	Hidrogenocarbonato de potasio 85% W/W <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> (cepa D747) 25% [WG] W/W
GIP (IDM)	HELIOSUFRE VITISAN VIVANDO BELLIS	Azufre 72% [+ Pinolene] [SC] W/V Hidrogenocarbonato de potasio 99,99% [SP] W/W Metrafenona 50% [SC] W/V Boscalid 25,2% + Piraclostrobin 12,8% [WG] W/W
GIP+ (IDM+)	GIP + Nutragreen®	GIP + Nutragreen® (1:10 ⁴) v/v
CON MR	SYSTHANE FORTE VIVANDO LUNA SENSATION	Myclobutanil 24% [EC] W/V Metrafenona 50% [SC] W/V Fluopyram 25% + Trifloxystrobin 25% [SC] W/V
CON+ MR	CON MR + Nutragreen®	CON MR + Nutragreen® (1:10 ⁴) v/v
CON EIAF (CON SAFE- ULE)	NIMROD Quattro SULFUR 80%	Bupirimato 25% [EC] W/V Azufre 80% [WP] W/W
CON+ EIAF (CON SAFE- ULE+)	CON EIAF + Nutra- green®	CON EIAF + Nutragreen® (1:10 ⁴) v/v

No-OGM: Organismo no modificado genéticamente; GIP: Gestión Integrada de Plagas; [EC]: Concentrado emulsionable; [SC]: Suspensión concentrada; [WP]: Polvo mojable; [SP]: Polvo soluble; [CS]: Suspensión encapsulada; [WG]: Gránulos dispersables en agua; W/W: Peso/Peso; W/V: Peso/Volumen; V/V: Volumen/Volumen

La respuesta a los tratamientos no presentó el mismo comportamiento en las dos parcelas, ya que la incidencia media en las plantas control difería de una parcela a otra. Los tratamientos evaluados en la parcela con mayor incidencia en las plantas control (EIAF-ULE)), apenas presentaban diferencias significativas respecto a las plantas control, mientras que en la parcela con menor incidencia (MR) algunos tratamientos de las alternativas sostenibles presentaban diferencias significativas con las plantas no tratadas. Lo cual indicó que la eficacia de los productos de residuo cero puede estar influenciado por el grado de incidencia de la enfermedad. En cualquier caso, los tratamientos ECO, AGR y CER, de residuo cero y control biológico, fueron los tratamientos que bajo las dos condiciones redujeron significativamente el área bajo la curva de infección en hoja respecto a las plantas no tratadas y sin diferencias significativas con los tratamientos CON y CON+.

El tratamiento ECO estaba formulado con extracto de *Equisetum arvense* y lecitina de soja. Este extracto con actividad antimicrobiana (Radulović *et al.*, 2006), está autorizado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (en inglés European Food Safety Authority, EFSA) como materia activa fungicida para el control de oídio en viñedo entre otros cultivos (EFSA, 2020). En trabajos previos, el uso de *E. arvense* tuvo buenos resultados de control para oídio en viñedo (Pike, 2014). No hay datos previos sobre su control de oídio en lúpulo y con este trabajo se pretendía evaluar la actividad del producto en el cultivo. Según los resultados, el uso de este producto fitosanitario de residuo cero, tuvo un control efectivo en hoja, minimizando el progreso de la infección en la parte foliar de la planta.

El tratamiento AGR entre sus materias activas incluía azufre e hidrogenocarbonato de potasio. El uso de azufre como fungicida está muy expandido, es de contacto y detiene el desarrollo del patógeno (Jiang, 2019). Actualmente, el control de oídio en lúpulo se basa principalmente en su aplicación al estar el resto de materias activas desautorizadas. El tratamiento IDA también contenía azufre en su formulado. Una de las razones por la cual IDA fuese menos efectivo pudo ser el menor porcentaje de azufre de la formulación.

El tratamiento CER estaba formulado con hidrogenocarbonato de potasio y el agente de biocontrol (BCA) *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*. Trabajos previos comprobaron que este BCA reducía la incidencia de oídio en tabaco (Jiao *et al.*, 2020) e inducía el sistema de defensa contra esta enfermedad en pepino (Li *et al.*, 2015). El uso de hidrogenocarbonato de potasio se empleó en cuatro tratamientos, AGR, CER, GIP (IDM) y GIP+ (IDM+), que mostraron unos resultados de control de la enfermedad en hoja significativamente mejores a las plantas no tratadas. Puede ser una materia activa efectiva contra esta enfermedad como se ha demostrado en otros cultivos, su uso ha resultado en control efectivo del oídio en cucurbitáceas (Ziv and Zitter, 1992; Abdel-Kader *et al.*, 2012).

En cuanto al grado de incidencia de los conos, sólo los tratamientos con productos de síntesis química lograron tener diferencias respecto a las plantas no tratadas, excepto SIP, que en la parcela con menor presión de la enfermedad consigue mostrar una reducción de la incidencia en conos.

El uso de nanotransportadores en los tratamientos CON+ e GIP+ presentó resultados de incidencia en algunos casos menores que los tratamientos con dosis completa sin nanotransportador. CON+ obtuvo valores significativamente distintos a las plantas control para índice de calidad en las dos parcelas. GIP+ presentó valores de incidencia en cono más bajos sin diferencias significativas con los tratamientos CON y CON+. Los resultados obtenidos de los tratamientos con nanotransportador y reducción de dosis del 30% pueden deberse al incremento de la eficiencia en el transporte de los compuestos dentro de la

planta ejercido por la nanotecnología (Wang *et al.*, 2022). Observaciones similares obtuvieron Carro-Huerga *et al.* (2018) en el que la reducción de dosis de plaguicida y fertilizantes en plantaciones de peral llevó a un manejo eficiente además de un aumento de la cantidad de sólidos solubles totales en el producto cosechado. El uso de la nanotecnología en la agricultura, ya sean nanoplaguicidas, nanofertilizantes o nanotransportadores puede ser de gran impacto en los objetivos hacia la obtención de cultivos más sostenibles y saludables (Wang *et al.*, 2022).

Por lo general, en las dos parcelas de ensayo, los tratamientos con productos de síntesis química mostraron resultados con menor incidencia de *P. macularis* en hoja y cono. No obstante, los resultados no siempre fueron significativamente distintos a los resultados de las plantas sin tratar. En algunos casos, el uso de productos de residuo cero y BCA redujo la incidencia de *P. macularis* al nivel de los tratamientos químicos. Los efectos del uso de *B. amyloliquefaciens* en el tratamiento CER podrían estar relacionados con la reducción de la enfermedad en hoja. El uso de nanotransportadores podría ser un recurso útil para el control de enfermedades con productos fitosanitarios de síntesis química con una reducción de su dosis, aunque actualmente, no hay productos autorizados para tal fin. Los resultados de los tratamientos de residuo cero y control biológico abren la posibilidad de explorar otros medios de control más eficaces para el control de enfermedades en el lúpulo y buscar microorganismos nativos adaptados a las condiciones medioambientales y al cultivo del lúpulo que puedan ejercer control biológico contra las enfermedades descritas en lúpulo.

Prospección y evaluación de microorganismos de suelo y planta con capacidad de biocontrol

Los resultados obtenidos con los ensayos preliminares de campo se detectaron resultados positivos de control empleando microorganismos. El uso de estos organismos beneficiosos adaptados a un determinado cultivo puede ser determinante para garantizar su eficacia (Cook, 1993). En los ensayos previos se observó un comportamiento beneficioso del BCA *B. amyloliquefaciens*, pero hay estudios que señalan que el lúpulo puede tener propiedades antimicrobianas contra bacterias Gram-positivas (Pollach *et al.*, 2002; Leite *et al.*, 2013). Resulta interesante explorar otros microorganismos presentes en las parcelas de cultivo sostenible de lúpulo que puedan tener habilidades de biocontrol y que estén adaptados a las condiciones medioambientales del cultivo. Con ese fin se llevó a cabo una prospección en suelos de las parcelas de lúpulo de la provincia de León. Se identificaron once aislamientos diferentes de *Trichoderma* de especies descritas previamente en bibliografía como posibles BCA (Tabla 3). Para evaluar la capacidad de esos aislamientos como posibles BCA se llevaron a cabo dos ensayos *in vitro* en placas Petri. Se realizaron ensayos de confrontación directa y de membrana contra tres aislamientos del patógeno del lúpulo *Fusarium*.

Fusarium spp. es un hongo de suelo que presenta inconvenientes a la hora de su control por su naturaleza y el carácter perenne de las plantaciones de lúpulo. Puede permanecer en el suelo durante largos periodos de tiempo con un desarrollo y crecimiento saprófito lo que hace que los métodos de control recomendados para otras enfermedades en este caso no sean efectivos. En muchos cultivos, para remediar esta limitación, se ha optado por el uso de BCA. En control de *Fusarium*, su utilización ha demostrado ser una posibilidad, bien con aislamientos no patogénicos de *Fusarium* spp. (Aimé *et al.*, 2008;

Porteous-Álvarez *et al.*, 2020), o con otros microorganismos beneficiosos como *Trichoderma* spp. (Blaya *et al.*, 2013; Martínez-Medina *et al.*, 2014; Błaszczuk *et al.*, 2017; Álvarez-García *et al.*, 2020; Ji, An, *et al.*, 2021; Mironenka *et al.*, 2021). En España, la cepa de *T. asperellum* T34 está registrada como uso menor autorizado por procedimiento nacional para el control de *Fusarium* en lúpulo (MAPA, 2023). El uso de cepas autóctonas tiene beneficios agronómicos al haber co-evolucionado con el cultivo y estar adaptados a las condiciones climáticas y ambientales del bioecosistema. Los aislamientos adaptados a un cultivo en particular pueden ser más efectivos que otros aislados de cultivos diferentes (Cook, 1993). Por lo tanto, uno de los objetivos que se plantearon en este trabajo fue buscar nuevas alternativas sostenibles basadas en el control biológico que permitan mejorar las perspectivas de sanidad vegetal del cultivo del lúpulo.

Tabla 3 Aislamientos de *Trichoderma* y *Fusarium* recolectados de parcelas de lúpulo de la provincia de León descritos en el Capítulo 2.

Código	Especie	Origen	Localización
T311	<i>T. hamatum</i>	Suelo	Gavilanes de Órbigo
T324	<i>T. hamatum</i>	Rizoma	San Román de la Vega
T312	<i>T. virens</i>	Suelo	Gavilanes de Órbigo
T317	<i>T. virens</i>	Rizoma	Nistal
T327	<i>T. gamsii</i>	Suelo	Seisón de la Vega
T316	<i>T. rossicum</i>	Rizoma	Gavilanes de Órbigo
T328	<i>T. rossicum</i>	Suelo	Gavilanes de Órbigo
T329	<i>T. harzianum</i>	Suelo	San Román de la Vega
T314	<i>T. spirale</i>	Suelo	Nistal
T319	<i>T. spirale</i>	Rizoma	Nistal
T323	<i>T. brevicompactum</i>	Suelo	San Román de la Vega
F076	<i>F. culmorum</i>	Suelo	San Román de la Vega
F103	<i>F. oxysporum</i>	Suelo	San Román de la Vega
F079	<i>F. sambucinum</i>	Rizoma	San Román de la Vega

Para la realización de los ensayos *in vitro* de esta tesis se hizo una prospección en parcelas de cultivo de lúpulo de la provincia de León (A.J. Porteous-Álvarez *et al.*, 2021). Los hongos aislados se identificaron mediante técnicas moleculares y se recogen en el capítulo 2. En la recolección de muestras de suelo y planta se identificaron distintas especies de *Trichoderma*, que, según la bibliografía consultada, ya se habían descrito como posibles especies con capacidades de control biológico. En una parcela en San Román de la Vega con síntomas asociados a las enfermedades causadas por *Fusarium* se recogieron tres aislados de *Fusarium* spp. En condiciones controladas de laboratorio, se evaluaron dos de los mecanismos de acción posibles de *Trichoderma*, la competencia por nutrientes y espacio, mediante ensayo en placa Petri de confrontación directa y la antibiosis, mediante ensayo en placa Petri utilizando membrana de celofán (Mayo *et al.*, 2015).

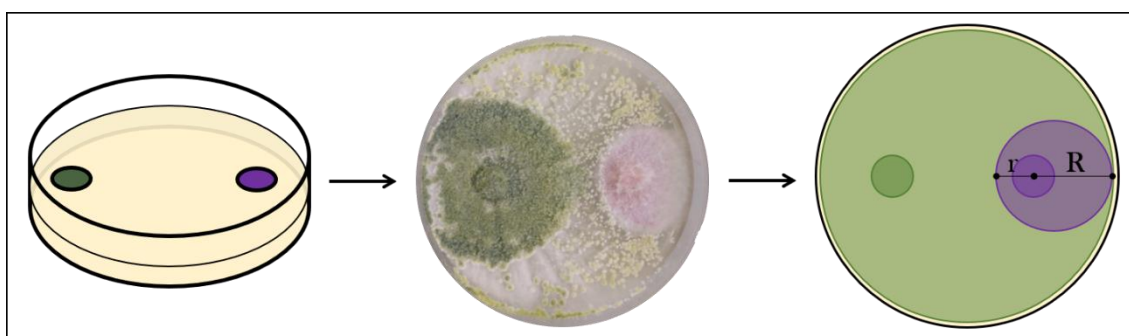


Figura 12 Esquema de los pasos consecutivos del ensayo de confrontación directa. El disco de color verde representa al agente de control biológico (BCA) y el disco de color morado al patógeno. “R” y “r” representan las medidas tomadas en la evaluación de inhibición.

En los ensayos de confrontación directa, la interacción entre los dos microorganismos puede deberse a dos mecanismos de acción, a la competencia por espacio y al micoparasitismo. Este ensayo mostró una visión de cómo puede interactuar el posible BCA en contacto directo con el patógeno (Campelo *et al.*, 2010). En los ensayos de membrana, la interacción entre el patógeno y el BCA se produce sin contacto físico los dos microorganismos. En este caso, el mecanismo de acción evaluado es la capacidad del BCA, bajo condiciones de laboratorio, de producir metabolitos secundarios que controlen o inhiban el crecimiento del patógeno (Mayo *et al.*, 2015).

En general, todos los aislamientos de *Trichoderma* en confrontación directa fueron capaces de inhibir el desarrollo de todos los aislamientos de *Fusarium* evaluados en este trabajo, por encima del 10% en *F. oxysporum* y *F. sambucinum* y de 35% en *F. culmorum*. Los aislamientos de *T. hamatum* T311 y T324 mostraron, por lo general, la mayor capacidad inhibidora frente a todos los aislamientos de *Fusarium*. Presentaron más del 35% en *F. sambucinum*, por encima del 45% en *F. oxysporum* y por encima del 65% de inhibición del crecimiento en *F. culmorum*.

En los ensayos de membrana, *F. sambucinum* se mostró más sensible a los metabolitos secundarios producidos por *T. hamatum* T311 y T324, *T. virens* T312 y T317 y *T. gamsii* T327, los cuales inhibieron su desarrollo por encima del 60%. Frente a *F. oxysporum* los aislamientos de *T. virens* T312 y T317 y *T. brevicompactum* T323 produjeron metabolitos secundarios que inhibieron su desarrollo en más de un 40%. En *F. culmorum*, los compuestos producidos por *T. hamatum* T311 y T324, *T. gamsii* T327 y *T. brevicompactum* T323 inhibieron su desarrollo en más de un 40%. Los aislamientos, *T. rossicum*

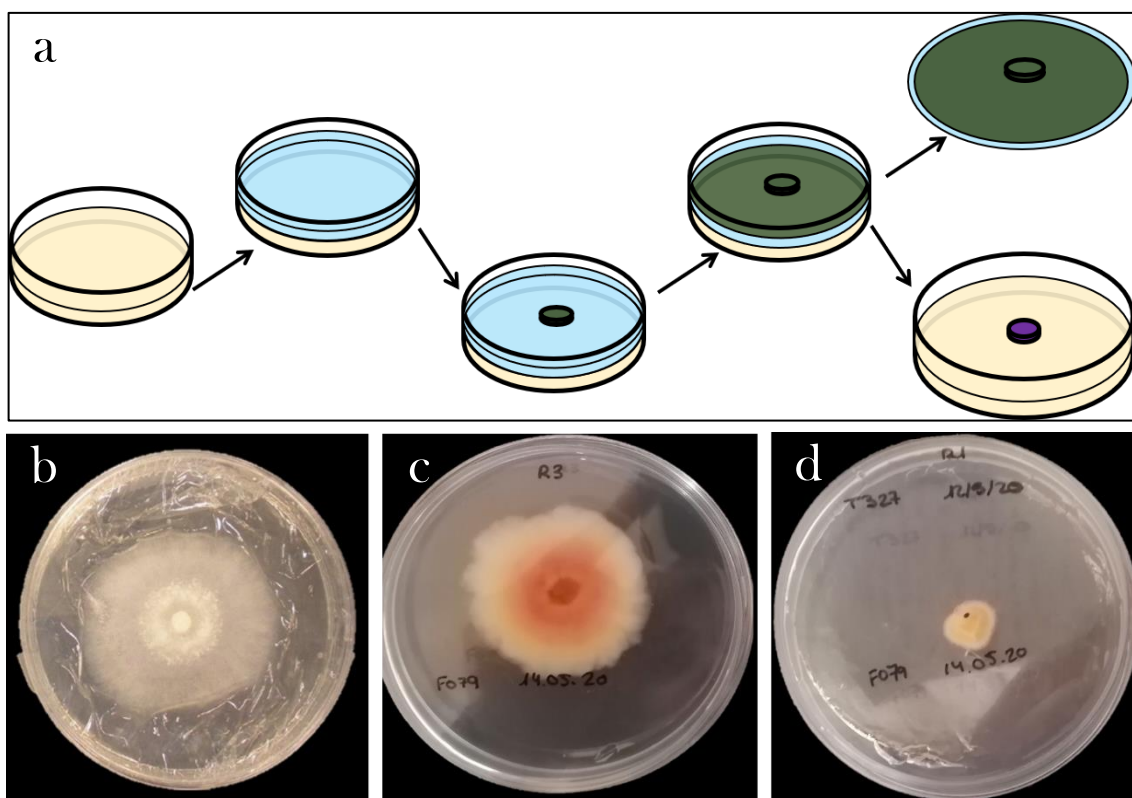


Figura 13 Ensayo de membrana a) Esquema de los pasos consecutivos del ensayo de membrana. El disco de color beige representa el medio de cultivo, el de color azul la membrana de celofán, el de color verde representa al agente de control biológico (BCA) y el de color morado al patógeno; b) *Trichoderma* spp. sobre la membrana de celofán; desarrollo de *Fusarium sambucinum* sobre c) una placa control y d) tras retirar la membrana con desarrollo de *Trichoderma* spp.

T328, *T. harzianum* T329 y *T. spirale* T319 no redujeron el desarrollo de *F. culmorum* (0%) en el ensayo de membrana. Esos mismos aislamientos frente al mismo patógeno, en confrontación directa presentaban porcentajes de inhibición de aproximadamente el 50%, lo que indicó que el principal mecanismo de acción de estos aislados frente a este patógeno pudo ser por competencia en el nicho.

Para el control de *F. sambucinum*, en confrontación directa la inhibición no superó el 50%, en cambio, en el ensayo de membrana, algunos aislados consiguieron superar ese porcentaje, incluso alcanzando un 75% en el caso de *T. gamsii* T327. La inhibición de fitopatógenos por los metabolitos secundarios producidos por *T. gamsii* ya se ha descrito con anterioridad. Anees et al. (2010) demostraron que, en ensayos de membrana, *T. gamsii* presentaba los mejores resultados de inhibición frente a *R. solani*, seguido de *T. harzianum* y *T. hamatum*. Mayo-Prieto et al. (2020) observaron como la producción de metabolitos secundarios de sus aislamientos de *T. gamsii* causaban más de un 80% de inhibición en *R. solani*. Matarese et al. (2012) observaron que los aislamientos de *T. gamsii* presentaban mejores resultados de control frente a *F. graminearum* y *F. culmorum* aislados de cereal. A partir de estos resultados se puede suponer que el mecanismo de acción principal de *T. gamsii* T327 es la antibiosis.

En ausencia del patógeno, algunos microorganismos no son capaces de producir metabolitos secundarios, es decir, que necesitan recibir señales derivadas del patógeno,

como detectar componentes de la pared celular o metabolitos secretados por el patógeno para poder producir los metabolitos con actividad antibiótica (Alfiky and Weisskopf, 2021). Kullnig et al. (2000) proponen un ensayo con dos membranas en el que crece *Trichoderma* antes y después del patógeno. De esa forma, si el patógeno emite señales al medio las puede detectar *Trichoderma* y desencadenar la producción de compuestos antibióticos.

En resumen, los aislamientos de las especies *T. hamatum*, *T. virens* y *T. gamsii* destacan por su habilidad de biocontrol, en confrontación directa (interacción física entre el patógeno y el BCA y competición por espacio y nutrientes) y en ensayos de membrana (la capacidad del BCA de producir metabolitos secundarios antagonicos a través de una membrana de celofán), por sus altos porcentajes de inhibición de *F. sambucinum*, *F. oxysporum* y *F. culmorum in vitro*.

Esta tesis representa las etapas preliminares para el estudio de la aplicación de este BCA en un cultivo con gran interés en grandes industrias como la cervecera y la farmacéutica y en el que cada vez hay menos productos autorizados para el control de sus plagas y enfermedades. Este trabajo identifica aislamientos de *Trichoderma* con potencial como BCA para poder ofrecer una nueva alternativa de control biológico eficiente en las parcelas de lúpulo en el futuro.

Promoción de crecimiento de *Trichoderma* en plántulas de lúpulo

Otro de los mecanismos de acción de *Trichoderma* descritos en la bibliografía es la promoción de crecimiento de las plantas. Es capaz de promover el crecimiento de plantas por diferentes mecanismos, aumentando el desarrollo radicular o la biomasa, el número de nudos o la longitud de los entrenudos, mejorando su adaptación a situaciones de estrés abiótico. El incremento de la biomasa de las plantas se ha asociado a la síntesis de compuestos derivados de las auxinas, como el ácido índole-3-acético (IAA) u otras fitohormonas como ácido giberélico (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Hoyos-Carvajal *et al.*, 2009; Garnica-Vergara *et al.*, 2016; Bader *et al.*, 2020). El aumento de la capacidad de absorción de nutrientes por la planta está asociado a la solubilización de fosfatos y micronutrientes como el hierro, magnesio o manganeso (Altomare and Tringovska, 2011; Vinale *et al.*, 2012). En este trabajo se evaluó la capacidad de los aislamientos de *Trichoderma* para promover el desarrollo de plántulas de lúpulo (Figura 14) en cámara de cultivo bajo condiciones controladas de humedad y temperatura.

Los efectos de la inoculación del BCA fueron más notables en el segundo mes después de la inoculación, aunque ya en el primer mes los aislamientos de las especies *T. rossicum* T328 y *T. virens* T312 mostraron un mayor número de nudos por planta y número de nudos por tallo trepador, respectivamente. En el segundo mes el desarrollo de las plantas tratadas con *T. hamatum* T311 y T324, *T. virens* T312, *T. gamsii* T327, *T. rossicum* T328 y *T. harzianum* T329 incrementaron su desarrollo tanto en número de tallos trepadores como en número total de nudos respecto al primer mes y significativamente más que las plantas que no fueron tratadas.

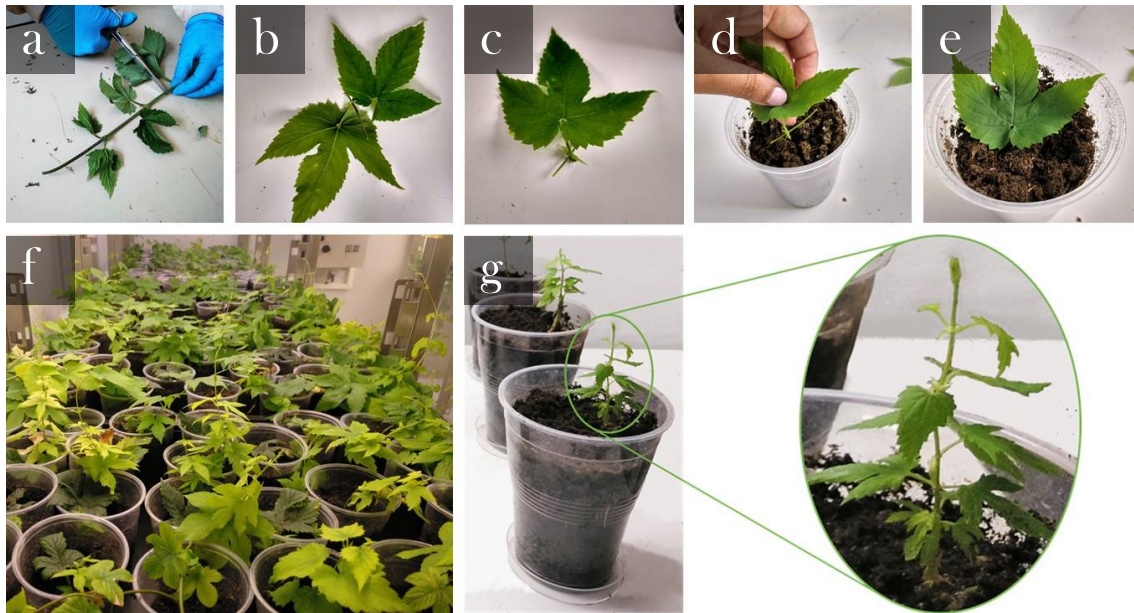


Figura 14 a-e) Pasos consecutivos para obtener planta nueva a partir de material vegetal de la parte aérea por reproducción vegetativa; f) Crecimiento en cámara de cultivo de plántula de lúpulo; g) Ejemplo de plántula de lúpulo al inicio de los ensayos de promoción de crecimiento con un tallo de cinco-seis nudos.

Como destacan otros trabajos previos, el uso de *Trichoderma* como bioestimulante puede ser un beneficio para acelerar el establecimiento del cultivo y posiblemente mejorar la producción. En cultivos ornamentales con rizoma, el pretratamiento, antes de brotar en primavera, con *T. asperellum* mejoró el desarrollo, el número de hojas y la altura de la planta respecto a las plantas no tratadas (Zsiláné-André *et al.*, 2019). El desarrollo de *Ara-bidopsis* fue mayor con *T. virens* (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009) o *T. atroviride* (Garnica-Vergara *et al.*, 2016) que sin tratamiento. Usando *T. harzianum* se aumentó el número de los entrenudos de la caña de azúcar (Singh *et al.*, 2010), el desarrollo de plantas de tomate (Bader *et al.*, 2020) y el número de inflorescencias en *Cannabis sativa* (Kakabouki *et al.*, 2021).

El uso de aislamientos autóctonos de *Trichoderma* como promotor del crecimiento ha sido evaluado por primera vez en este trabajo. Los resultados obtenidos son prometedores para ser aplicados en nuevas plantaciones de lúpulo con manejo sostenible para acelerar el establecimiento del cultivo, promover una rápida entrada en producción y alcanzar rendimientos que permitan a los productores amortizar las elevadas inversiones.

Bioeconomía de residuos del lúpulo como fuente de carbono para el desarrollo de *Trichoderma*

Como objetivo de este trabajo, además de mejorar la sanidad vegetal del lúpulo con estrategias ecosostenibles, se persiguió reutilizar parte de los residuos que se generan tras la cosecha. En la cosecha del lúpulo se producen tres grupos de residuos, los tallos trepadores, las hojas y restos de conos. Estos restos de conos son brácteas y bractéolas que se desprenden del raquis y que la industria no acepta. La propuesta de trabajo fue evaluar si los residuos generados se podían aprovechar como fuente de carbono para el desarrollo de BCA en recubrimientos de semilla.

En la actualidad, el recubrimiento de semillas suele incluir compuestos como nutrientes o plaguicidas para favorecer el desarrollo de éstas. *Trichoderma* puede ejercer beneficios agronómicos mejorando la disponibilidad de nutrientes o protegiendo a la planta frente a fitopatógenos con distintos mecanismos de acción. Existen recubrimientos de semillas con distintos BCA, en los cuales, su acción depende de la disponibilidad de materia orgánica o carbono que haya en el medio. Los microorganismos necesitan tener una fuente de este elemento para poder desarrollarse (Afonso *et al.*, 2021), y por consecuencia, llevar a cabo las funciones por las que han sido seleccionados. La fuente de carbono suele ser un recurso biológico y su obtención puede ser un limitante. Con esta tecnología se busca este recurso, que no tiene un valor comercial, pero que se produce inevitablemente en la cosecha de lúpulo y de esta forma revalorizarlo.

En particular, *Trichoderma* es un microorganismo saprófito y micoparásito, por lo que para su correcto desarrollo necesita disponer de fuentes de carbono y nitrógeno (Danielson and Davey, 1973). Los residuos de origen vegetal contienen celulosa que puede degradarse por las enzimas celulolíticas que sintetiza *Trichoderma*. Un recubrimiento de semillas con restos biológicos de la cosecha del lúpulo puede tener beneficios en la estimulación del desarrollo del BCA y por lo tanto facilitar su desempeño beneficioso para la semilla. Esta solución representa una alternativa sostenible y ejemplo de bioeconomía circular ya que, con los residuos de una industria se puede mejorar y aportar materias primas con valor añadido a otra.

Como BCA, *Trichoderma* se ha preparado en distintos formulados para su aplicación en campo que pasan por formulados líquidos, sólidos o recubrimiento de semillas. En formulaciones sólidas se han utilizado fuentes de nutrición para *Trichoderma* como paja, arroz u otros residuos agrícolas. En formulados de semillas, Dubey *et al.* (2011) evaluaron distintas formulaciones de pildorado combinando *Trichoderma* y carboximetilcelulosa (CMC) para el tratamiento de semillas de mungo, Dal Bello *et al.* (2002) lo realizaron con semillas de trigo. La obtención de carboximetil-celulosa se realiza mediante modificación química de la celulosa por procedimientos industriales (Rahman *et al.*, 2021). En el meta-análisis realizado por Lamichhane (2022) se obtuvo que, de los más de 300 trabajos analizados, sólo los tratamientos de semilla tratados con *Trichoderma* incrementaron significativamente el rendimiento de cosecha. El objetivo fue evaluar el uso de residuos de lúpulo ricos en celulosa como fuente de carbono para el desarrollo de *Trichoderma* y utilizarlo como recubrimiento eficaz de distintas semillas.

El desarrollo de esta tecnología, propone una aplicación de valor añadido para todos aquellos residuos del lúpulo que no se pueden aprovechar. En una plantación estándar de lúpulo, la producción de conos supone cerca de un 30% del peso total, es decir, que un 70% son residuos. Se han llevado a cabo investigaciones por otros grupos de investigación para dar una reutilización a ese alto porcentaje de residuos. En muchas ocasiones esa solución ha sido el compostaje (Luskar *et al.*, 2022), que es la forma más eficiente de reutilizar material vegetal (Pergola *et al.*, 2018). En algunas de esas investigaciones se ha visto el beneficio de usar hojas y las trepas para tal fin (Afonso *et al.*, 2021). Se han encontrado otras aplicaciones para las trepas como materia prima para la fabricación de bandejas y macetas (BioTHOP, 2019). En la tecnología propuesta en este trabajo se ofrece la posibilidad de reducir los residuos de cosecha de lúpulo y reinvertirlos en el ecosistema favoreciendo el desarrollo de BCA en pildorados de semillas con aplicaciones beneficiosas y sostenibles para otros cultivos.

En este trabajo se evaluó el comportamiento de dos tipos de residuos, las hojas y los restos de conos, con el objetivo de favorecer el desarrollo del BCA *Trichoderma* spp. Se comparó el desarrollo de *Trichoderma* sobre un sustrato de turba frente a su desarrollo en los residuos elegidos. Tras 15 días de incubación se extrajo el ADN total de cada muestra para evaluar la cantidad de *Trichoderma* desarrollado en cada sustrato. El desarrollo de *T. harzianum* T019 se vio favorecido por el sustrato de restos de conos, más que por las hojas. Este éxito puede estar influenciado por el contenido en fenoles. Las hojas de lúpulo presentan concentración más baja de fenoles totales en comparación con la composición de los conos (Abram *et al.*, 2015). Según Arrieta-Escobar y Belin (1982), los cuales pueden favorecer el desarrollo de *T. viride* y la producción de celulasas, permitiendo a *Trichoderma* una mejor asimilación de carbono y, en consecuencia, mejor desarrollo. Langezaal *et al.* (1992) observaron que los aceites esenciales de *H. lupulus* tenían actividad contra bacterias Gram-positivas y el hongo *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*, pero no contra la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* y el hongo *Candida albicans*. En el presente trabajo se observó que los conos de lúpulo no afectaban al desarrollo de *T. harzianum* T019.

Se evaluó el pildorado de semillas con el recubrimiento a base de restos de conos. El recubrimiento de éstas no afectó al porcentaje de germinación en las semillas de alfalfa, lenteja, trigo, girasol, judía, maíz y melón, incluso aumentó la biomasa de las plántulas de brócoli en un 270% y del melón en un 118%. El recubrimiento de las semillas pasado un mes no afectó al porcentaje de germinación de todas las semillas evaluadas, excepto para judía que lo redujo en un 15% y para garbanzo y melón que lo aumentó en un 120% y 250%, respectivamente. Por lo general, el pildorado de las semillas se mantuvo estable en el tiempo.

Se evaluó el pildorado de semillas con el recubrimiento de restos de conos y el BCA *Trichoderma* en sustrato. El pildorado con *Trichoderma* mejoró el porcentaje de germinación de todas las semillas evaluadas, así como la biomasa y longitud del sistema radicular con diferencias significativas respecto a las semillas de trigo y judía no tratadas. Destaca la promoción en la germinación del trigo con cuatro veces más semillas germinadas y un incremento de la biomasa y de la longitud del sistema radicular del 160%, respecto al control.

La presente tecnología permite revalorizar un desecho vegetal rico en celulosa y polifenoles y transformarlo en una fuente de carbono para microorganismos en el recubrimiento de semillas. De este modo, aportar una solución sostenible para la promoción del desarrollo de plántulas en los primeros estadios, en los que la planta puede ser más débil ante posibles limitaciones bióticas o abióticas y fomentar la bioeconomía circular del cultivo del lúpulo.

Referencias

- Abdel-Kader, M. M., El-Mougy, N. S. y Embaby, E. I. (2012) "Resistance inducers treatments against downy and powdery mildews of cucumber under commercial plastic houses conditions", *Australian journal of basic and applied sciences*, 6(5), pp. 249-259. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/286017566> (Accedido: 3 de junio de 2021).
- Abram, V., Čeh, B., Vidmar, M., Hercezi, M., Lazić, N., Bucik, V., Možina, S. S., Košir, I. J., Kač, M., Demšar, L. y Poklar Ulrih, N. (2015) "A comparison of antioxidant and antimicrobial activity between hop leaves and hop cones", *Industrial crops and products*. Elsevier B.V., 64, pp. 124-134. doi:10.1016/j.indcrop.2014.11.008.
- Afonso, S., Arrobas, M., Pereira, E. L. y Rodrigues, M. Â. (2021) "Recycling nutrient-rich hop leaves by composting with wheat straw and farmyard manure in suitable mixtures", *Journal of environmental management*. Academic Press, 284. doi:10.1016/j.jenvman.2021.112105.
- Aimé, S., Cordier, C., Alabouvette, C. y Olivain, C. (2008) "Comparative analysis of *PR* gene expression in tomato inoculated with virulent *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and the biocontrol strain *F. oxysporum* Fo47", *Physiological and molecular plant pathology*, 73(1-3), pp. 9-15. doi:10.1016/J.PMPP.2008.10.001.
- Alfiky, A. y Weisskopf, L. (2021) "Deciphering *Trichoderma*-plant-pathogen interactions for better development of biocontrol applications", *Journal of fungi*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 7(1), pp. 1-18. doi:10.3390/JOF7010061.
- Altomare, C. y Tringovska, I. (2011) "Beneficial soil microorganisms, an ecological alternative for soil fertility management", en *Sustainable agriculture reviews*, pp. 161-214. doi:10.1007/978-94-007-1521-9_6.
- Álvarez-García, S., Mayo-Prieto, S., Gutiérrez, S. y Casquero, P. A. (2020) "Self-inhibitory activity of *Trichoderma* soluble metabolites and their antifungal effects on *Fusarium oxysporum*", *Journal of fungi*, 6(3), p. 176. doi:10.3390/jof6030176.
- Anees, M., Tronsmo, A., Edel-Hermann, V., Hjeljord, L. G., Héraud, C. y Steinberg, C. (2010) "Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*", *Fungal biology*, 114(9), pp. 691-701. doi:10.1016/j.funbio.2010.05.007.
- Arrieta-Escobar, A. y Belin, J. M. (1982) "Effects of polyphenolic compounds on the growth and cellulolytic activity of a strain of *Trichoderma viride*", *Biotechnology and bioengineering*, 24, pp. 983-989.
- Bader, A. N., Salerno, G. L., Covacevich, F. y Consolo, V. F. (2020) "Native *Trichoderma harzianum* strains from Argentina produce indole-3 acetic acid and phosphorus solubilization, promote growth and control wilt disease on tomato (*Solanum lycopersicum* L.)", *Journal of king Saud University - Science*. Elsevier B.V., 32(1), pp. 867-873. doi:10.1016/j.jksus.2019.04.002.
- BioTHOP (2019) *About the project*. Disponible en: <https://www.life-biot-hop.eu/project/about-the-project/> (Accedido: 4 de mayo de 2023).

Błaszczuk, L., Basińska-Barczak, A., Ćwiek-Kupczyńska, H., Gromadzka, K., Popiel, D. y Stępień, Ł. (2017) "Suppressive effect of *Trichoderma* spp. on toxigenic *Fusarium* species", *Polish journal of microbiology*. Polish Society of Microbiologists, 66(1), pp. 85-100. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29359702/> (Accedido: 15 de abril de 2021).

Blaya, J., López-Mondéjar, R., Lloret, E., Pascual, J. A. y Ros, M. (2013) "Changes induced by *Trichoderma harzianum* in suppressive compost controlling *Fusarium* wilt", *Pesticide biochemistry and physiology*. Elsevier Inc., 107(1), pp. 112-119. doi:10.1016/j.pestbp.2013.06.001.

Campelo, M. P., Cardoza, R. E., Lorenzana, A., Hermosa, M. R., Monte, E., Reinoso, B., Gutiérrez, S. y Casquero, P. A. (2010) "Biological control of phytopathogenic fungi in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma virens*", *Bean improvement cooperative*, 53, pp. 114-115.

Carro-Huerga, G., Rodríguez-González, Á., Mayo-Prieto, S., Álvarez-García, S., Gutiérrez, S. y Casquero, P. A. (2018) "Use of the carrier Nutragreen® for reducing fertilizers and pesticides in pear trees", en *4º Simpósio nacional de fruticultura*. Faro (Portugal) 29-30 November: Associação Portuguesa de Horticultura, p. 121.

Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C. y López-Bucio, J. (2009) "*Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*", *Plant physiology*, 149(3), pp. 1579-1592. doi:10.1104/pp.108.130369.

Cook, R. J. (1993) "Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens", *Annual review of phytopathology*, 31, pp. 53-80.

Dal Bello, G. M., Mónaco, D. I. y Simón, M. R. (2002) "Biological control of seedling blight of wheat caused by *Fusarium graminearum* with beneficial rhizosphere microorganisms", *World journal of microbiology & biotechnology*, 18, pp. 627-636.

Danielson, R. M. y Davey, C. B. (1973) "Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma*", *Soil biology and biochemistry*, 5, pp. 505-515.

Dubey, S. C., Bhavani, R. y Singh, B. (2011) "Integration of soil application and seed treatment formulations of *Trichoderma* species for management of wet root rot of mungbean caused by *Rhizoctonia solani*", *Pest management science*, 67(9), pp. 1163-1168. doi:10.1002/ps.2168.

EFSA (2020) "Outcome of the consultation with Member States and EFSA on the basic substance application for approval of *Equisetum arvense* L. for the extension of use in plant protection against fungal diseases on horticulture and vegetable crops", *EFSA supporting publications*. Wiley, 17(6). doi:10.2903/SP.EFSA.2020.EN-1869.

Garnica-Vergara, A., Barrera-Ortiz, S., Muñoz-Parra, E., Raya-González, J., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L., Ruiz-Herrera, L. F. y López-Bucio, J. (2016) "The volatile 6-pentyl-2 H -pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and *ETHYLENE INSENSITIVE 2* functioning", *New phytologist*. Blackwell Publishing Ltd, 209(4), pp. 1496-1512. doi:10.1111/nph.13725.

Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S. y Bissett, J. (2009) "Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*", *Biological control*. Academic Press, 51(3), pp. 409-416. doi:10.1016/j.biocontrol.2009.07.018.

Jiang, X. (ed.) (2019) *Sulfur chemistry*. Cham: Springer International Publishing (Topics in Current Chemistry Collections). doi:10.1007/978-3-030-25598-5.

Jiao, R., Munir, S., He, Pengfei, Yang, H., Wu, Y., Wang, J., He, Pengbo, Cai, Y., Wang, G. y He, Y. (2020) "Biocontrol potential of the endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* YN201732 against tobacco powdery mildew and its growth promotion", *Biological control*. Elsevier, 143(August 2019), p. 104160. doi:10.1016/j.biocontrol.2019.104160.

Ji, S., An, Y., Zhang, H., Wang, Y. y Liu, Z. (2021) "*Trichoderma* biofertilizer (mix-TroTha) mediates *Malus sieversii* resistance to *Alternaria alternata*", *Biological control*. Elsevier Inc., 156(1), p. 104539. doi:10.1016/j.biocontrol.2021.104539.

Kakabouki, I., Tataridas, A., Mavroeidis, A., Kousta, A., Karydogianni, S., Zisi, C., Kouneli, V., Konstantinou, A., Folina, A., Konstantas, A. y Papastylianou, P. (2021) "Effect of colonization of *Trichoderma harzianum* on growth development and CBD content of hemp (*Cannabis sativa* L.)", *Microorganisms*, 9(3), p. 518. doi:10.3390/microorganisms9030518.

Kullnig, C., Mach, R. L., Lorito, M. y Kubicek, C. P. (2000) "Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *T. harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma* ech42 gene expression before mycoparasitic contact", *Applied and environmental microbiology*, 66(5), pp. 2232-2234. doi:10.1128/AEM.66.5.2232-2234.2000.

Lamichhane, J. R. (2022) "Biological seed treatments promote crop establishment and yield : a global meta-analysis", *Agronomy for sustainable development*. Agronomy for Sustainable Development, 42(45). doi:https://doi.org/10.1007/s13593-022-00761-z.

Langezaal, C. R., Chandra, A. y Scheffer, J. J. C. (1992) "Antimicrobial screening of essential oils and extracts of some *Humulus lupulus* L. cultivars", *Pharmaceutisch weekblad scientific edition*, 14(6), pp. 353-356.

Leite, I. R., Faria, J. R., Marquez, L. D. S., Reis, M. H. M., De Resende, M. M., Ribeiro, E. J. y Cardoso, V. L. (2013) "Evaluation of hop extract as a natural antibacterial agent in contaminated fuel ethanol fermentations", *Fuel processing technology*. Elsevier, 106, pp. 611-618. doi:10.1016/J.FUPROC.2012.09.050.

Li, Y., Gu, Y., Li, J., Xu, M., Wei, Q. y Wang, Y. (2015) "Biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic resistance against cucurbits powdery mildew", *Frontiers in microbiology*, 6(8), pp. 1-15. doi:10.3389/fmicb.2015.00883.

Luskar, L., Polanšek, J., Hladnik, A. y Čeh, B. (2022) "On-farm composting of hop plant green waste - chemical and biological value of compost", *Applied sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 12(9), p. 4190. doi:10.3390/app12094190.

MAPA (2023) *Registro de productos fitosanitarios*, Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. Disponible en: <https://servicio.mapa.gob.es/regfiweb#> (Accedido: 8 de mayo de 2023).

Martínez-Medina, A., Del Mar Alguacil, M., Pascual, J. A. y Van Wees, S. C. M. (2014) "Phytohormone profiles induced by *Trichoderma* isolates correspond with their biocontrol and plant growth-promoting activity on melon plants", *Journal of chemical ecology*, 40(7), pp. 804-815. doi:10.1007/s10886-014-0478-1.

Matarese, F., Sarrocco, S., Gruber, S., Seidl-Seiboth, V. y Vannacci, G. (2012) "Biocontrol of *Fusarium* head blight: Interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*", *Microbiology*. Microbiology Society, 158(1), pp. 98-106. doi:10.1099/MIC.0.052639-0/CITE/REFWORKS.

Mayo-Prieto, S., Campelo, M. P., Lorenzana, A., Rodríguez-González, A., Reinoso, B., Gutiérrez, S. y Casquero, P. A. (2020) "Antifungal activity and bean growth promotion of *Trichoderma* strains isolated from seed vs soil", *European journal of plant pathology*. Springer Science and Business Media B.V., 158(4), pp. 817-828. doi:10.1007/s10658-020-02069-8.

Mayo, S., Gutiérrez, S., Malmierca, M. G., Lorenzana, A., Campelo, M. P., Hermosa, R. y Casquero, P. A. (2015) "Influence of *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma* spp. in growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and in the induction of plant defense-related genes.", *Frontiers in plant science*, 6, p. 685. doi:10.3389/fpls.2015.00685.

Mironenka, J., Różalska, S., Soboń, A. y Bernat, P. (2021) "*Trichoderma harzianum* metabolites disturb *Fusarium culmorum* metabolism: Metabolomic and proteomic studies", *Microbiological research*, 249(11), p. 126770. doi:10.1016/j.micres.2021.126770.

Pergola, M., Persiani, A., Palese, A. M., Di Meo, V., Pastore, V., D'Adamo, C. y Celano, G. (2018) "Composting: the way for a sustainable agriculture", *Applied soil ecology*. Elsevier B.V., 123, pp. 744-750. doi:10.1016/j.apsoil.2017.10.016.

Pike, B. P. (2014) *Effect of organic, biodynamic and conventional vineyard management inputs on grapevine growth and susceptibility to powdery mildew and Botrytis bunch rot*. University of Adelaide.

Pollach, G., Hein, W. y Beddie, D. (2002) "Application of hop β -acids and rosin acids in the sugar industry", *Zuckerindustrie*, 127(12), pp. 921-930.

Porteous-Álvarez, A. J., Mayo-Prieto, S., Álvarez-García, S., Reinoso, B. y Casquero, P. A. (2020) "Genetic response of common bean to the inoculation with indigenous *Fusarium* isolates", *Journal of fungi*. MDPI AG, 6(4), p. 228. doi:10.3390/jof6040228.

Porteous-Álvarez, A. J., Mayo-Prieto, S., Carro-Huerga, G., Rodríguez-González, Á., Álvarez-García, S., del Ser, S., Lorenzana, A., Campelo, M. P., Maldonado-González, M. M., Gutiérrez, S. y Casquero, P. A. (2021) "*Trichoderma* species isolated from hop soils in the Órbigo valley, León, Spain", *Acta horticulturae*. Stuttgart (Germany), (1328), pp. 63-66. doi:10.17660/ActaHortic.2021.1328.8.

Radulović, N., Stojanović, G. y Palić, R. (2006) "Composition and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L. essential oil", *Phytotherapy research*. John Wiley and Sons Ltd, 20(1), pp. 85-88. doi:10.1002/PTR.1815.

Rahman, Md. S., Hasan, Md. S., Nitai, A. S., Nam, S., Karmakar, A. K., Ahsan, Md. S., Shiddiky, M. J. A. y Ahmed, M. B. (2021) "Recent developments of carboxymethyl cellulose", *Polymers*, 13(8), p. 1345. doi:10.3390/polym13081345.

Singh, P., Awasthi, Shashivind Kumar, Lal, Ram Ji, Singh, V., Singh, P. N., Yadav, R. L., Awasthi, S K, Joshi, B. B., Singh, R. K., Lal, R J y Duttamajumder, S. K. (2010) "Increasing the efficacy of *Trichoderma harzianum* for nutrient uptake and control of red rot in sugarcane", *Journal of horticulture and forestry*, 2(4), pp. 66-71. Disponible en: <http://www.academicjournals.org/jhf>.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Ruocco, M., Woo, S. y Lorito, M. (2012) "*Trichoderma* secondary metabolites that affect plant metabolism", *Natural product communications*, 7(11), pp. 1545-1550. doi:10.1177/1934578X1200701133.

Wang, D., Saleh, N. B., Byro, A., Zepp, R., Sahle-Demessie, E., Luxton, T. P., Ho, K. T., Burgess, R. M., Flury, M., White, J. C. y Su, C. (2022) "Nano-enabled pesticides for sustainable agriculture and global food security", *Nature nanotechnology*. Nature Publishing Group, 17(4), pp. 347-360. doi:10.1038/s41565-022-01082-8.

Ziv, O. y Zitter, T. A. (1992) "Effects of bicarbonates and film-forming polymers on cucurbit foliar diseases", *Plant diseases*, 76, pp. 513-517.

Zsiláné-André, A., Vámos, A., Molnár, B., Szabolcs, Á. y Holb, I. J. (2019) "Effect of six pre-storage rhizome treatments on rhizome vitality and seasonal growth characteristics of three *Canna × generalis* cultivars", *Scientia horticulturae*. Elsevier, 254(12), pp. 155-162. doi:10.1016/j.scienta.2019.04.076.



C Conclusiones



Conclusiones

- El uso de tratamientos orgánicos, de residuo cero y de control biológico realiza un control efectivo de la incidencia del oídio en hojas, pero no en conos.
- El uso de la nanotecnología con nanotransportadores permite reducir la dosis comercial de productos de síntesis química manteniendo un control efectivo de la incidencia de la enfermedad tanto en hoja como en cono.
- La presencia de oídio en conos reduce el índice de cosecha y la producción de alfa-ácidos. Un control efectivo de la enfermedad es fundamental para optimizar estos parámetros.
- Se han aislado e identificado once aislamientos autóctonos de *Trichoderma* susceptibles de ser empleadas como agentes de control biológico.
- Los aislamientos autóctonos T311 y T324 identificados como *T. hamatum* compiten por el espacio y los nutrientes, inhibiendo eficazmente el desarrollo de los aislamientos de *Fusarium*.
- Los aislamientos autóctonos T311 (*T. hamatum*) y T327 (*T. gamsii*) producen metabolitos secundarios eficaces para el control de *F. culmorum* y *F. sambucinum*.
- Los aislamientos autóctonos T311 and T324 (*T. hamatum*), T312 (*T. virens*), T327 (*T. gamsii*), T328 (*T. rossicum*) y T329 (*T. harzianum*) tienen capacidad para promover el crecimiento de plántulas de lúpulo.
- Los aislamientos autóctonos T311 y T324 (*T. hamatum*), T312 (*T. virens*), T327 (*T. gamsii*), T328 (*T. rossicum*) y T329 (*T. harzianum*) son candidatos para desarrollar una solución sostenible para el control biológico de enfermedades y/o la promoción del crecimiento en lúpulo.
- Los restos de conos de lúpulo son una fuente de carbono eficiente para la elaboración de inoculantes con aislamientos de *Trichoderma* autóctonos basados en una bioeconomía circular.

Conclusions

- The use of zero residue and biocontrol treatments effectively managed the powdery mildew disease incidence on leaves but not on cones.
- The use of nanotechnology with nanocarriers allows the reduction of the commercial dose of chemically synthesized products maintaining effective control of the disease incidence on leaves and cones.
- The incidence of powdery mildew on cones reduces the yield index and Alpha-acid production. Effective disease control is crucial to optimize these parameters.
- Eleven *Trichoderma* autochthonous isolates have been collected capable of being used as biocontrol agents.
- The autochthonous isolates T311 and T324, identified as *T. hamatum*, compete effectively for space and nutrients, inhibiting the development of the *Fusarium* isolates.
- The autochthonous isolates T311 (*T. hamatum*) and T327 (*T. gamsii*) produce secondary metabolites active against *F. culmorum* y *F. sambucinum*.
- The autochthonous isolates T311 and T324 (*T. hamatum*), T312 (*T. virens*), T327 (*T. gamsii*), T328 (*T. rossicum*), and T329 (*T. harzianum*) can promote hop plantlet growth.
- The autochthonous isolates T311 y T324 (*T. hamatum*), T312 (*T. virens*), T327 (*T. gamsii*), T328 (*T. rossicum*) y T329 (*T. harzianum*) are candidates to develop a sustainable solution for the biological control of diseases and/or promote hop growth.
- The hop harvest by-products are an efficient carbon source for the elaboration of inoculants with autochthonous *Trichoderma* isolates based on a circular bioeconomy.



Perspectivas de futuro



Perspectivas de futuro

Durante los años de la elaboración de esta tesis doctoral, el trabajo ha dado resultados que no están contemplados en este documento. Se ha progresado en las líneas de investigación abiertas tras los ensayos publicados en la línea de búsqueda de nuevas alternativas sostenibles para el control de enfermedades fúngicas del lúpulo. Tras la identificación de los aislamientos de *Trichoderma* con capacidad antagónica contra *Fusarium* spp. y su capacidad de promoción del crecimiento del lúpulo, se han desarrollado varias líneas de trabajo realizándose en la actualidad el procesamiento de los datos:

Influencia de la inoculación de *Trichoderma* autóctono en el microbioma del suelo en función de sus características edafológicas

Se ha evaluado cómo influye la inoculación de *Trichoderma* en el suelo de parcelas de lúpulo. Un aislamiento de *Trichoderma* derivado del trabajo de esta tesis (*T. hamatum* T311) se ha empleado para el desarrollo del proyecto *TrichoBIOme*, enmarcado dentro de la acción internacional *Fields-forever* de la compañía estadounidense Biome Makers Inc. En este proyecto se ha estudiado la influencia en la microbiota del suelo y los factores edáficos de parcelas de lúpulo de la provincia de León.

Control biológico de oídio con aislamientos de *Trichoderma* autóctonos

Se ha evaluado *Trichoderma* como posible agente de control biológico contra *Podosphaera macularis* en ensayos de campo sobre planta viva. Dos aislamientos de *Trichoderma* derivados del trabajo de esta tesis (*T. hamatum* T311 y *T. virens* T312) se han evaluado en condiciones de campo para determinar su capacidad de control.

Compuestos para elaboración de un inoculante que tiene como base a aislamientos autóctonos de *Trichoderma* para aplicar en la parte aérea de las plantas

Se ha realizado un estudio *in vitro* para elaborar un formulado de *Trichoderma*. Se ha evaluado la influencia de distintos compuestos en el desarrollo de *Trichoderma* en placa Petri. Los compuestos evaluados con mejor rendimiento formarán parte de un formulado completo: nutrientes, adherentes y fotoprotectores, para garantizar una mayor supervivencia de *Trichoderma* en la parte aérea.

Influencia de las características de la plantación y su manejo en la calidad del lúpulo

Se ha colaborado con la SAT Lúpulos de León en el análisis del lúpulo para su comercialización. Con los datos recopilados, se pretende ofrecer una información agrupada de la situación actual de las parcelas y variedades cultivadas en la provincia de León y cómo influyen los diferentes parámetros evaluados entre los que se encuentra la influencia del manejo, los tratamientos fitosanitarios, las variedades, la edad de la plantación, el tamaño de la parcela, los parámetros de calidad y la producción de alfa-ácidos.

Si bien los resultados presentados en esta tesis son prometedores, es preliminar y aún queda mucho trabajo en este campo de investigación. Los trabajos derivados de esta tesis anteriormente citados serán publicados para contribuir a la ampliación del conocimiento del lúpulo y su manejo sostenible en la provincia de León. En conjunto, todas estas investigaciones descritas en la tesis y en las perspectivas de futuro tienen el potencial de contribuir al desarrollo del cultivo sostenible y de la bioeconomía del lúpulo.



universidad
de león