



universidad  
de león

**ESCUELA DE INGENIERÍA AGRARIA Y FORESTAL**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**GRADO EN INGENIERÍA AGRARIA MENCIÓN EN  
INGENIERÍA RURAL**

**CONTROL BIOLÓGICO *in vitro* DE *Fusarium* EN LÚPULO**

***In vitro* BIOLOGICAL CONTROL OF *Fusarium* IN HOPS**

Alumno: Alexia Fernández Marcos

Tutor: Pedro Antonio Casquero Luelmo

Co-tutor: Sara Mayo Prieto

León, Diciembre, 2020

## ANEXO 9. HOJA DE CONFORMIDAD

### TRABAJOS DE CARÁCTER CIENTÍFICO O TÉCNICO

Título: **Control biológico in vitro de Fusarium en lúpulo**

Autor: **Alexia Fernández Marcos**

#### ELEMENTOS DE OBLIGADA APARICIÓN

- Resumen.** De 400 palabras como máximo.
- Introducción.** Debe incluir los motivos por los que se realiza el trabajo y los antecedentes o estudios previos sobre el mismo.
- Objetivos.** Se detallarán de forma clara y concisa los objetivos que se pretenden alcanzar.
- Material y Métodos / Metodología.** Descripción de las técnicas, los materiales empleados, y los métodos de análisis de datos, de forma que se garantice la repetibilidad de los mismos.
- Resultados / Análisis / Diagnóstico.** La información obtenida con el estudio se presentará de forma sistemática, preferentemente mediante tablas y figuras que deberán ser en todo caso autoexplicativas, y deberán aparecer debidamente numeradas y referenciadas en un índice propio.
- Discusión.** Los resultados propios del trabajo deberán ser discutidos relacionándolos, en su caso, con otros de estudios precedentes.
- Conclusiones.** Deberán ser claras, concisas, y coherentes con los objetivos propuestos. En el caso planes de ordenación de recursos forestales, propuestas concretas con objetivos, líneas y medidas.
- Planos / Mapas.** Serán obligatorios en trabajos topográficos, estudios de implantación de cultivos o transformaciones de explotaciones, y en general, cualquier trabajo técnico o científico asociado a áreas, parcelas, o territorios determinados.
- Bibliografía.** Listado de las fuentes de información utilizadas debidamente referenciadas y ordenadas.

<p>OBTENIDA LA CONFORMIDAD <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>DENEGADA LA CONFORMIDAD <input type="checkbox"/> (No se autoriza la presentación)</p>	<p>El tutor/es:</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding-right: 20px;"> <p><b>CASQUERO LUELMO PEDRO ANTONIO - 11947192A</b></p> <p>Firmado digitalmente por CASQUERO LUELMO PEDRO ANTONIO - 11947192A Fecha: 2020.11.24 20:16:41 +01'00'</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p><b>MAYO PRIETO SARA - 71440764G</b></p> <p>Firmado digitalmente por MAYO PRIETO SARA - 71440764G Fecha: 2020.11.24 12:22:37 +01'00'</p> </td> </tr> </table> <p>Fdo.: Pedro A. Casquero Luelmo      Fdo.: Sara Mayo Prieto</p>	<p><b>CASQUERO LUELMO PEDRO ANTONIO - 11947192A</b></p> <p>Firmado digitalmente por CASQUERO LUELMO PEDRO ANTONIO - 11947192A Fecha: 2020.11.24 20:16:41 +01'00'</p>	<p><b>MAYO PRIETO SARA - 71440764G</b></p> <p>Firmado digitalmente por MAYO PRIETO SARA - 71440764G Fecha: 2020.11.24 12:22:37 +01'00'</p>
<p><b>CASQUERO LUELMO PEDRO ANTONIO - 11947192A</b></p> <p>Firmado digitalmente por CASQUERO LUELMO PEDRO ANTONIO - 11947192A Fecha: 2020.11.24 20:16:41 +01'00'</p>	<p><b>MAYO PRIETO SARA - 71440764G</b></p> <p>Firmado digitalmente por MAYO PRIETO SARA - 71440764G Fecha: 2020.11.24 12:22:37 +01'00'</p>		



## RESUMEN

El cultivo del lúpulo (*Humulus lupulus* L.) tiene gran importancia económica en la provincia de León, donde se produce casi el 95 % del lúpulo español. Por este motivo es necesario centrar esfuerzos en encontrar mejoras y soluciones a problemas del cultivo para conseguir aumentar su competitividad y que sean sostenibles.

Si bien es cierto que las enfermedades más importantes que afectan al lúpulo son el mildiu y el oídio, la incidencia de *Fusarium* spp. también conlleva pérdidas de producción y de calidad, sin embargo no hay mucha información sobre este patógeno en el cultivo del lúpulo.

Un método de control para las enfermedades causadas por *Fusarium* spp. es mediante el empleo de agentes de biocontrol como *Trichoderma* spp. obtenidos mediante muestreo de suelo en parcelas de cultivo de lúpulo afectadas de patógenos de suelo, y que por lo tanto están adaptadas tanto a las condiciones ambientales como al cultivo.

Este estudio se basa en evaluar la capacidad de inhibición *in vitro* de diferentes aislados de *Trichoderma* sobre el desarrollo de tres especies de *Fusarium* (*F. culmorum*, *F. sambucinum* y *F. oxysporum*), con el fin de encontrar un método de control efectivo y sostenible. Para ello se evaluó la capacidad de inhibición *in vitro* de 11 aislados de *Trichoderma* frente a las tres especies de *Fusarium* mediante ensayos de membranas de celofán y ensayos duales, los aislados de *Trichoderma* inhibieron el desarrollo de *Fusarium* encontrándose diferencias entre los diferentes aislados, de los que *T. gamsii* (T327) fue el que mejores capacidades para el control del patógeno demostró.

Los ensayos realizados constituyen sólo un estudio preliminar, siendo necesario testarlos en condiciones de invernadero y en campo para la selección de aislados de *Trichoderma* que contribuyan al control de *Fusarium* spp. en el cultivo del lúpulo.

**Palabras clave:** *Humulus lupulus*, *Trichoderma*, confrontación directa, cultivo con membranas.



## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	II
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Evolución del cultivo del lúpulo.....	1
1.1.1. El lúpulo en el mundo.....	1
1.1.2. El lúpulo en España.....	2
1.1.3. El lúpulo en Castilla y León .....	4
1.2. Taxonomía y descripción botánica .....	4
1.3. Cultivo del lúpulo.....	7
1.4. Plagas y enfermedades.....	9
1.4.1. Plagas.....	9
1.4.2. Enfermedades.....	12
1.5. Control de fitopatógenos en el cultivo del lúpulo .....	24
1.6. Agentes de control biológico: <i>Trichoderma</i> spp.....	27
1.6.1. Taxonomía y morfología de <i>Trichoderma</i> .....	28
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	32
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	33
3.1. Obtención de aislados .....	33
3.1.1. Muestra de suelo.....	34
3.1.2. Muestras de rizoma.....	36
3.2. Identificación de los aislados.....	37
3.3. Conservación de los aislados.....	38
3.4. Ensayos antifúngicos <i>in vitro</i> .....	38
3.4.1. Preparación de aislados de estudio.....	38
3.4.2. Ensayo mediante el uso de membranas.....	39
3.4.3. Ensayo mediante confrontación directa .....	40
<b>4. RESULTADOS</b> .....	43
4.1. Aislados obtenidos en las parcelas de estudio.....	43



4.2. Ensayos <i>in vitro</i> .....	43
4.2.1. <i>Fusarium oxysporum</i> .....	44
4.2.2. <i>Fusarium sambucinum</i> .....	46
4.2.3. <i>Fusarium culmorum</i> .....	49
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	<b>52</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>57</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>58</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de la producción (t) y de la superficie (ha) del lúpulo en el mundo entre los años 1998-2018 (FAO, 2018). .....	1
Figura 2. Proporción de la producción de lúpulo en el mundo en 2018 (FAO, 2018). .....	2
Figura 3. Instalaciones de la Sociedad Anónima Española (S.A.E.) de Fomento del Lúpulo en Betanzos. Foto: Lutega.....	3
Figura 4. Variaciones de las hojas de lúpulo (Neve, 1991). .....	4
Figura 5. (a) Brote joven; (b) Flores masculinas; (c) Flores masculinas y femeninas de una planta monoica; (d) Anteras con glándulas de resina en los surcos (Neve, 1991).....	5
Figura 6. (a) Brotes de flores jóvenes que se desarrollan en las axilas de las hojas; (b) Inflorescencia femenina joven con estigmas papilados; (c) Cono maduro de "Fuggle"; (d) Cono maduro de "Wye Target"; (e) Cono maduro de "Yeoman"; (f) Eje central del cono (raquis); (g) Bráctea; (h) Bractéola con semilla; (i) Bractéola sin semilla; (j) Semilla (Neve, 1991).....	6
Figura 7. Conos de lúpulo. Foto: Lúpulos de León. ....	6
Figura 8. Sistema de alambrada de una plantación de lúpulo. Foto: Sara Mayo Prieto. ....	7
Figura 9. Peladora de lúpulo en explotación en La Milla del Río (León). Foto: Sara Mayo Prieto. ....	8
Figura 10. <i>Tetranychus urticae</i> sobre hojas de lúpulo. Foto: Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales.....	9
Figura 11. Efectos del ataque de <i>T. urticae</i> en una parcela de cultivo de lúpulo. Foto: Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales. ....	9
Figura 12. Síntomas del ataque de <i>T. urticae</i> sobre hojas y conos de lúpulo. Foto: Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales. ....	10
Figura 13. <i>Phorodon humuli</i> . Foto: Alicia Lorenzana de la Varga.....	10
Figura 14. <i>P. humuli</i> en conos de lúpulo. Foto: Alicia Lorenzana de la Varga.....	11
Figura 15. Síntomas del ataque de <i>P. humuli</i> sobre hojas y conos de lúpulo. Foto: Alicia Lorenzana de la Varga.....	11
Figura 16. Vista al microscopio de <i>Alternaria alternata</i> . Foto: Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales.....	12
Figura 17. Coloraciones marrones en los conos de lúpulo provocadas por <i>A. alternata</i> . Foto: Laboratorio de Plagas y Enfermedades Vegetales.....	12
Figura 18. Vista al microscopio de <i>Peronospora humuli</i> . Foto: M <sup>a</sup> Piedad Campelo Rodríguez.....	13
Figura 19. Hojas de lúpulo con síntomas de ataque de <i>P. humuli</i> . Foto: M <sup>a</sup> Piedad Campelo Rodríguez .....	13



Figura 20. Amarilleamiento de las hojas de lúpulo provocadas por <i>P. humuli</i> . Foto: Sara Mayo Prieto. .....	14
Figura 21. Vista al microscopio de <i>Sphaerotheca humuli</i> visto al microscopio. Foto: M <sup>a</sup> Piedad Campelo Rodríguez.....	14
Figura 22. Manchas pulverulentas del micelio de <i>S. humuli</i> sobre hojas y conos de lúpulo. Foto: Sara Mayo Prieto (derecha) y Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales (izquierda). .....	15
Figura 23. Síntomas en hojas y conos de lúpulo del ataque de <i>S. humuli</i> . Foto: Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales.....	15
Figura 24. Vista al microscopio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . Foto: Soraya Álvarez Vallejo.....	15
Figura 25. Micelio blanco algodonoso de <i>S. sclerotiorum</i> en tallos de lúpulo. Foto: M. L. Putnam. ....	16
Figura 26. Vista al microscopio de <i>Botrytis cinerea</i> . Foto: Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales.....	16
Figura 27 Izquierda: crecimiento de hifas de color gris de <i>B. cinerea</i> sobre planta de lúpulo. Foto: Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales. Derecha: oscurecimiento de la punta de un cono de lúpulo provocada por <i>B. cinerea</i> . Foto: Sebastien Radisek. ....	16
Figura 28. Vista al microscopio de <i>Verticillium dahliae</i> .Foto: Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales.....	17
Figura 29. Síntomas de la invasión de raíces y tallos de plantas de lúpulo por <i>V. dahliae</i> . Foto: D. H. Gent (derecha) y Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales (izquierda). ....	17
Figura 30. Vista al microscopio de <i>Fusarium</i> spp. Foto: M <sup>a</sup> Piedad Campelo Rodríguez.....	18
Figura 31. Síntomas en rizoma y tallos de lúpulo de la infección <i>Fusarium</i> spp. Foto: Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales. ....	19
Figura 32. <i>Fusarium oxysporum</i> en medio de cultivo Patata-Dextrosa-Agar (PDA). Foto: Elaboración propia. ....	21
Figura 33. <i>Fusarium culmorum</i> en medio de cultivo Patata-Dextrosa-Agar (PDA). Foto: Elaboración propia. ....	21
Figura 34. <i>Fusarium sambucinum</i> en medio de cultivo Patata-Dextrosa-Agar (PDA). Foto: Elaboración propia. ....	22
Figura 35. Síntomas provocados por <i>F. sambucinum</i> en los conos de lúpulo. Foto: D. H. Gent, S. J. Pethybridge. ....	23
Figura 36. Desarrollo de micelio de <i>Fusarium</i> spp sobre el tallo de lúpulo. Foto: D. H. Gent. ....	23
Figura 37. Diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> en medio de cultivo Patata-Dextrosa-Agar (PDA). Foto: Elaboración propia (izquierda), Sara Mayo Prieto (derecha). ....	28
Figura 38. Vista al microscopio de <i>Trichoderma</i> spp. Foto: Elaboración propia.....	29



Figura 39. Recogida de muestras de suelo y rizoma en parcelas de cultivo de lúpulo. Foto: Sara Mayo Prieto.....	33
Figura 40. Muestra de suelo en bandeja y tamiz de 1 mm de diámetro. Foto: Elaboración propia.....	34
Figura 41. Matraces Erlenmeyer con las muestras de suelo en agitador a 300 rpm. Foto: Elaboración propia. ....	35
Figura 42. Diluciones seriadas y siembra de las muestras de suelo en la campana de flujo laminar. Foto: Elaboración propia. ....	35
Figura 43. Siembra de las diluciones de la muestra de suelo en placas Petri con medio agar rosa de Bengala-cloranfenicol con ayuda de un asa de siembra en forma de L. Foto: Elaboración propia. ....	36
Figura 44. Aislados obtenidos en placas Petri con medio agar rosa de Bengala-cloranfenicol a partir de las muestras de suelo y rizoma. Foto: Sara Mayo Prieto .....	37
Figura 45. Placa Petri con medio Patata-Dextrosa-Agar (PDA) con <i>Trichoderma</i> spp. sobre membrana de celofán. Foto: Sara Mayo Prieto.....	39
Figura 46. Medición del diámetro de la colonia de <i>F. oxysporum</i> en el control del cultivo de membranas. Foto: Elaboración propia.....	40
Figura 47. (a) Siembra de cultivo dual en placa Petri con medio de cultivo Patata-Dextrosa-Agar (PDA); (b) Plantilla para siembra de cultivo dual. Foto: Elaboración propia.....	41
Figura 48. Medición de las distancias r1 y r2 en cultivo dual de <i>F. oxysporum</i> (F103) y <i>T. hamatum</i> (T324). Foto: Elaboración propia.....	41
Figura 49. Porcentaje de inhibición de los aislados de <i>Trichoderma</i> frente a <i>F. oxysporum</i> (F103) en el ensayo mediante el uso de membranas. Color azul oscuro: porcentajes en el día 5 del ensayo. Color azul claro: porcentajes en el día 8 del ensayo. Los valores con letras diferentes presentan diferencias significativas (test DMS, $p < 0,05$ ). Las letras minúsculas corresponden al análisis estadístico del ensayo mediante el uso de membranas del día 5 y las mayúsculas al del día 8. ....	44
Figura 50. Crecimiento de <i>F. oxysporum</i> (F103) en ensayo de membranas. (a) F103 con <i>T. virens</i> (T312); (b) F103 con <i>T. virens</i> (T317); (c) F103 con <i>T. brevicompactum</i> (T323); (d) F103 con <i>T. rossicum</i> (T316); (e) F103 con <i>T. rossicum</i> (T328); (f) F103 con <i>T. harzianum</i> (T329); (f) control de F103. Fotos: Elaboración propia. ....	45
Figura 51. Porcentaje de inhibición de los aislados de <i>Trichoderma</i> frente a <i>F. oxysporum</i> (F103) en el ensayo mediante confrontación directa. Color azul: porcentaje en el día 5 del ensayo. Los valores con letras diferentes presentan diferencias significativas (test DMS, $p < 0,05$ ).....	45
Figura 52. Crecimiento de <i>F. oxysporum</i> (F103) (derecha) frente a <i>Trichoderma</i> (izquierda) ensayo dual. (a) F103 con <i>T. hamatum</i> (T311); (b) F103 con <i>T. hamatum</i> (T324); (c) F103 con <i>T. gamsii</i> (T327); (d) F103 con <i>T. spirale</i> (T314); (e) F103 con <i>T. rossicum</i> (T328). Fotos: Elaboración propia.....	46



Figura 53. Porcentaje de inhibición de los aislados de *Trichoderma* frente a *F. sambucinum* (F079) en el ensayo mediante el uso de membranas. Color naranja oscuro: porcentajes en el día 5 del ensayo. Color naranja claro: porcentajes en el día 8 del ensayo. Los valores con letras diferentes presentan diferencias significativas (test DMS,  $p < 0,05$ ). Las letras minúsculas corresponden al análisis estadístico del ensayo mediante el uso de membranas del día 5 y las mayúsculas al del día 8..... 46

Figura 54. Crecimiento de *F. sambucinum* (F079) en ensayo de membranas. (a) F079 con *T. gamsii* (T327); (b) F079 con *T. rossicum* (T316); (c) F079 con *T. rossicum* (T328); (d) control de F079. Foto: Elaboración propia. .... 47

Figura 55. Porcentaje de inhibición de los aislados de *Trichoderma* frente a *F. sambucinum* (F079) en el ensayo mediante confrontación directa. Color naranja: porcentaje en el día 5 del ensayo. Los valores con letras diferentes presentan diferencias significativas (test DMS,  $p < 0,05$ )..... 48

Figura 56. Crecimiento de *F. sambucinum* (F079) (derecha) frente a *Trichoderma* (izquierda) en ensayo dual. (a) F079 con *T. hamatum* (T311); (b) F079 con *T. virens* (T314); (c) F079 con *T. gamsii* (T327); (d) F079 con *T. rossicum* (T328). Fotos: Elaboración propia..... 48

Figura 57. . Porcentaje de inhibición de los aislados de *Trichoderma* frente a *F. culmorum* (F076) en el ensayo mediante el uso de membranas. Color verde oscuro: porcentajes en el día 5 del ensayo. Color verde claro: porcentajes en el día 8 del ensayo. Los valores con letras diferentes presentan diferencias significativas (test DMS,  $p < 0,05$ ). Las letras minúsculas corresponden al análisis estadístico del ensayo mediante el uso de membranas del día 5 y las mayúsculas al del día 8. .... 49

Figura 58. Crecimiento de *F. culmorum* (F076) en ensayo de membranas. (a) F076 con *T. hamatum* (T311); (b) F076 con *T. brevicompactum* (T323); (c) F076 con *T. hamatum* (T324); (d) F076 con *T. gamsii* (T327); (e) F076 con *T. rossicum* (T316) (f) F076 con *T. spirale* (T319); (g) F076 con *T. rossicum* (T328); (h) F076 con *T. harzianum* (T329); (i) control de F076. Fotos: Elaboración propia..... 50

Figura 59. Porcentaje de inhibición de los aislados de *Trichoderma* frente a *F. culmorum* (F076) en el ensayo mediante confrontación directa. Color verde: porcentaje en el día 5 del ensayo. Los valores con letras diferentes presentan diferencias significativas (test DMS,  $p < 0,05$ )..... 50

Figura 60. Crecimiento de *F. culmorum* (F076) (izquierda) frente a *Trichoderma* (derecha) en ensayo dual. (a) F076 con *T. hamatum* (T311); (b) F076 con *T. hamatum* (T324); (c) F076 con *T. rossicum* (T316); (d) F076 con *T. rossicum* (T328). Fotos: Elaboración propia. .... 51



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Superficie (ha), rendimiento (kg/ha) y producción (t) de lúpulo en España en 2018 (MAPA, 2018).....	3
Tabla 2. Agentes de biocontrol autorizados para el control de hongos fitopatógenos (MAPA, 2020c). .....	26
Tabla 3. Parcelas seleccionadas para el muestreo.....	33
Tabla 4. Aislados de <i>Trichoderma</i> y de <i>Fusarium</i> utilizados en los ensayos <i>in vitro</i> -.....	43



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Evolución del cultivo del lúpulo

### 1.1.1. *El lúpulo en el mundo*

El lúpulo (*Humulus lupulus* L.) es un cultivo muy importante a nivel mundial para la producción de cerveza, ya que es una materia prima que le proporciona varias propiedades organolépticas como puede ser su característico amargor. También tiene uso como planta medicinal e incluso como alimento humano (Magadán Marcos *et al.*, 2011).

En los últimos 20 años la producción de lúpulo ha evolucionado de manera positiva. La producción mundial disminuyó hasta alcanzar 111.623 toneladas en el año 2006. A partir de entonces, con pequeñas oscilaciones, ha ido aumentando hasta llegar a las 149.235 toneladas en 2018 (FAO, 2018).

La superficie dedicada a este cultivo se ha mantenido más o menos estable hasta el año 2009, a partir del cual se ha producido un descenso llegando a las 75.465 ha en 2010. A partir del año 2012 la superficie cultivada ha comenzado a aumentar hasta alcanzar las 91.730 ha en 2018 (FAO, 2018).

Como se puede observar en la Figura 1, hace 20 años la superficie cultivada era mayor que la producción. En la actualidad, la situación ha revertido y la producción es mayor que la superficie cultivada. Esto significa que de cada hectárea cultivada en la actualidad se obtiene mayor producción que hace 20 años, es decir, han mejorado las técnicas de cultivo logrando una mayor eficiencia de las producciones (FAO, 2018).

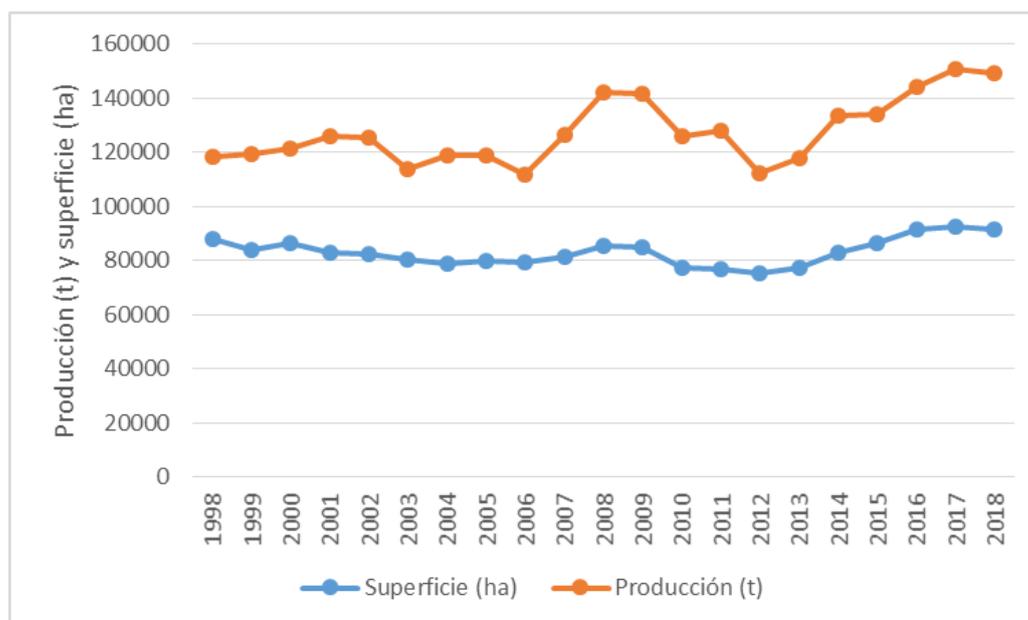


Figura 1. Evolución de la producción (t) y de la superficie (ha) del lúpulo en el mundo entre los años 1998-2018 (FAO, 2018).



Analizando por continentes, en el año 2018, América y Europa han sido las regiones más productoras de lúpulo en el mundo, seguidas de África (Figura 2). Estados Unidos ha tenido una producción de 48.492 toneladas, seguido de Etiopía (38.111 t) y de Alemania (32.527 t) (FAO, 2018).

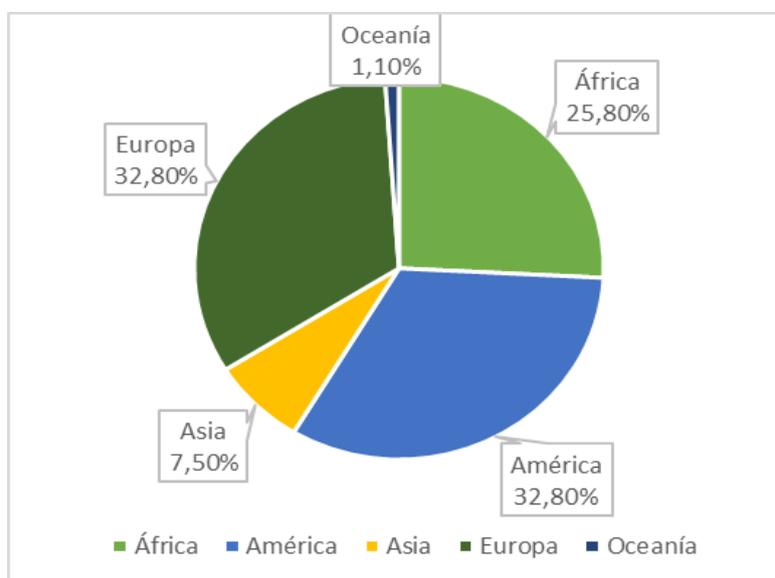


Figura 2. Proporción de la producción de lúpulo en el mundo en 2018 (FAO, 2018).

En el caso de Europa, en 2018, se ha producido 48.963 t de lúpulo (32,8% de la producción mundial, Figura 2) con una superficie cultivada de 30.417 ha. Como se ha mencionado antes, Alemania ha sido el país europeo con la mayor producción (32.527 t), seguido de República Checa (5.126 t) y Eslovenia (3.078 t). España es el sexto productor europeo de lúpulo con una producción de 915 t (FAO, 2018).

### 1.1.2. El lúpulo en España

El cultivo del lúpulo en España comenzó a tener importancia después de la Segunda Guerra Mundial (1939-1945), cuando la dificultad de las cerveceras españolas para abastecerse de lúpulo alemán hizo que el Ministerio de Agricultura autorizara en 1945 la creación una asociación anónima dedicada al apoyo de dicho cultivo. Esta asociación fue la Sociedad Anónima Española (S.A.E.) de Fomento del Lúpulo que tuvo su primera delegación en Betanzos y estaba constituida mayoritariamente por las cerveceras existentes en el país en aquel momento (Figura 3).



Figura 3. Instalaciones de la Sociedad Anónima Española (S.A.E.) de Fomento del Lúpulo en Betanzos. Foto: Lutega.

El resultado de la creación de esta asociación fue un incremento del cultivo del lúpulo lográndose el objetivo de abastecer de lúpulo al sector cervecero nacional (Breuer, 1985).

En un principio, el cultivo del lúpulo se centró en la parte norte de España, en las regiones de Galicia, Asturias, Santander, País Vasco y Navarra (Breuer, 1985).

Sin embargo, en la actualidad, en España no se cubre la demanda nacional. Es un sector muy condicionado por las exigencias de la industria cervecera, a la que destina el 98% de la producción. El resto se dedica a la fabricación de productos cosméticos y terapéuticos (MAPA, 2020b).

Según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación en el año 2018 se cultivaron en España un total de 573 ha de lúpulo obteniendo una producción de 915 t, distribuidas en las comunidades de Castilla y León, Cataluña, Navarra y La Rioja, (Tabla 1) (MAPA, 2018).

Tabla 1. Superficie (ha), rendimiento (kg/ha) y producción (t) de lúpulo en España en 2018 (MAPA, 2018).

Provincias y Comunidades Autónomas	Superficie (ha)			Rendimiento (kg/ha)		Producción (t)
	Secano	Regadío	Total	Secano	Regadío	
<b>NAVARRA</b>	-	<b>9</b>	<b>9</b>	-	<b>1.456</b>	<b>13</b>
<b>LA RIOJA</b>	-	<b>7</b>	<b>7</b>	-	<b>124</b>	<b>1</b>
Gerona	4	7	11	1.000	2.000	18
Lérida	-	2	2	-	1.750	4
Tarragona	-	8	8	-	1.800	14
<b>CATALUÑA</b>	<b>4</b>	<b>17</b>	<b>21</b>	<b>1.000</b>	<b>1.876</b>	<b>36</b>
León	-	536	536	-	1.614	865
<b>CASTILLA Y LEÓN</b>	-	<b>536</b>	<b>536</b>	-	<b>1.614</b>	<b>865</b>
<b>ESPAÑA</b>	<b>4</b>	<b>569</b>	<b>573</b>	<b>1.000</b>	<b>1.601</b>	<b>915</b>

A pesar de que en las dos últimas décadas tanto la superficie como la producción se ha reducido a la mitad, en la actualidad la tendencia de la superficie es ligeramente positiva. En 2018 las



hectáreas cultivadas (573 ha) se incrementaron entre un 0,35% y un 6% sobre el año anterior y la media de las últimas cinco campañas, respectivamente (MAPA, 2018).

El valor de la producción de lúpulo en 2014, según datos del Anuario de Estadística del MAPA, fue de 3,93 M€ lo que representa un 0,02% de la producción vegetal.

### 1.1.3. El lúpulo en Castilla y León

Castilla y León con 865 t de lúpulo en 2018 ha representado casi el 95% de la producción española, cultivándose la mayoría en la provincia de León (Tabla 1) (MAPA, 2018).

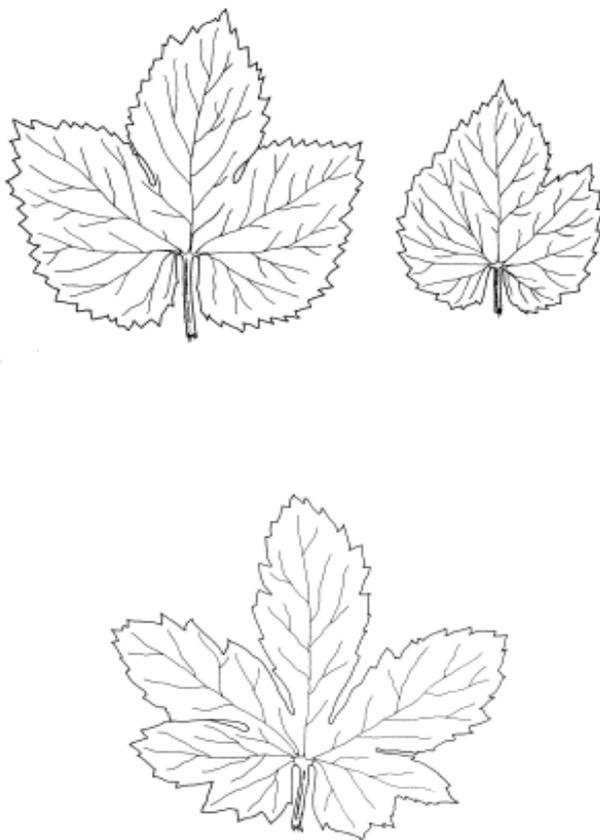


Figura 4. Variaciones de las hojas de lúpulo (Neve, 1991).

En esta provincia, el cultivo se lleva a cabo en la ribera del río Órbigo. Se introdujo al encontrarse una abundante presencia de plantas silvestres de lúpulo en la zona y pensando que se podría adaptar bien dadas sus características climáticas y edafológicas. Tras la formación de la S.A.E. de Fomento del Lúpulo, muchos agricultores de la zona apostaron por este cultivo produciéndose un incremento de 7 ha en el 1950 a unas 1.950 ha en 1983 (Breuer, 1985).

El éxito fue tal que, en 1952, la S.A.E de Fomento del lúpulo construyó una factoría central con secaderos de lúpulo en el municipio de Carrizo de la Ribera (León).

## 1.2. Taxonomía y descripción botánica

El lúpulo (*H. lupulus*) es una planta que pertenece al orden Urticales, a la familia Cannabiaceas, al género *Humulus*, el cual está formado por tres especies: *H. lupulus*, *H. japonicus* y *H. yunnanensis*.

Es una planta trepadora, dioica y perenne que no posee zarcillos. Su tallo es hueco, piloso, de color verde o violeta de sección hexagonal y que crece en sentido dextroso, es decir trepan alrededor del soporte en sentido horario, pudiendo alcanzar hasta 12 m de longitud (Neve, 1991).



Las hojas son opuestas y nacen en pares a partir de las estípulas presentes en el tallo, tienen el borde dentado, son pilosas y están divididas en lóbulos que normalmente van de 3 a 5 llegando a tener hasta 7 lóbulos (Neve, 1991). (Figura 4).

Las flores de las plantas masculinas (Figura 5) se agrupan en panículas, tienen un perianto de cinco sépalos de color verde amarillento y cinco anteras de filamentos cortos. Las anteras tienen un surco donde se almacenan las glándulas de resina, que se abren al producir grandes cantidades de polen que son transportadas por el viento (Neve, 1991).

Las flores de las plantas femeninas (Figura 6) se presentan en inflorescencias llamadas cono que tiene una forma de piña ovoide. Se sitúan alrededor de un eje central llamado raquis. En este eje central se encuentran una serie de nudos, en cada uno hay un par de brácteas, con un par de bractéolas y cada una tiene una flor (Neve, 1991).

La flor (Figura 7) está formada por un ovario encerrado en el perianto con un par de estigmas papilados. A medida que las inflorescencias maduran, el eje central se alarga y las brácteas y bractéolas se engrosan formándose el cono que es el producto comercial de la planta (Neve, 1991)

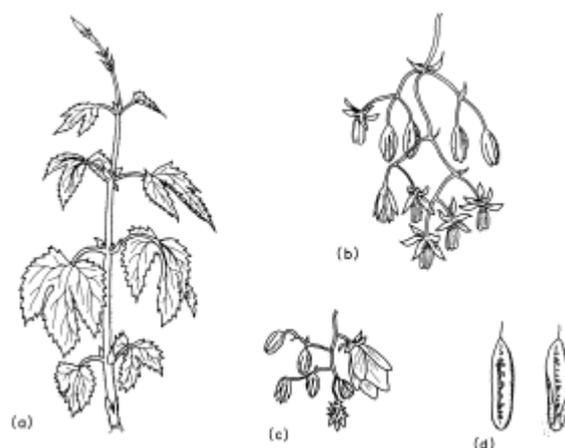


Figura 5. (a) Brote joven; (b) Flores masculinas; (c) Flores masculinas y femeninas de una planta monoica; (d) Anteras con glándulas de resina en los surcos (Neve, 1991).

En los conos de la flor femenina se encuentra una sustancia de color amarillo llamada lupulina que representa el valor comercial del lúpulo y está formada por resinas, de las cuales los  $\alpha$ -ácidos son las más importantes aportando el amargor a la cerveza, y por aceites esenciales que aportan el aroma (Neve, 1991).

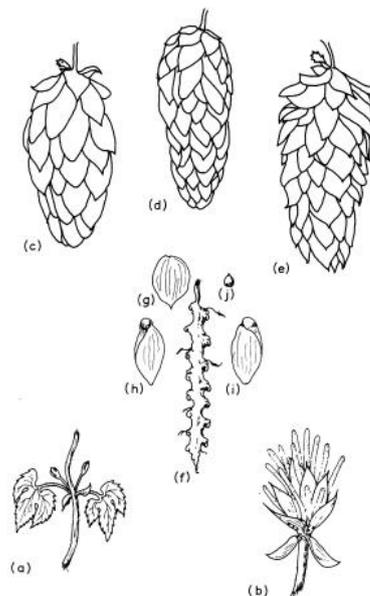


Figura 6. (a) Brotes de flores jóvenes que se desarrollan en las axilas de las hojas; (b) Inflorescencia femenina joven con estigmas papilados; (c) Cono maduro de "Fuggle"; (d) Cono maduro de "Wye Target"; (e) Cono maduro de "Yeoman"; (f) Eje central del cono (raquis); (g) Bráctea; (h) Bractéola con semilla; (i) Bractéola sin semilla; (j) Semilla (Neve, 1991).

Existen grandes variaciones entre los genotipos tanto en el número como en el tamaño de las glándulas en los conos siendo importantes desde el punto de vista comercial (Neve, 1991).



Figura 7. Conos de lúpulo. Foto: Lúpulos de León.

Al ser plantas dioicas la autopolinización es prácticamente imposible. Por ello son plantas genéticamente muy heterocigóticas, lo que significa que la reproducción a partir de semillas tiene como consecuencia una progenie muy variable. Este tipo de reproducción mediante semillas es utilizado para la obtención de nuevas variedades. Para la producción de un cultivo de características deseadas la reproducción del lúpulo es vegetativa a través de rizoma o en esquejes. La parte aérea de la planta muere cada año. Sin embargo la parte subterránea es perenne y puede vivir varios años, normalmente entre 12 y 15 años (Neve, 1991).

El sistema radicular de una planta madura puede crecer hacia abajo hasta 1,5 m y lateralmente hasta 2-3 m (Neve, 1991). Consta de dos partes: una parte pivotante situada en la zona superior, donde se asientan las yemas o brotes en estado de dormancia (cabeza o cepa), y otra parte profunda donde están el resto de raíces verticales y es responsable del desarrollo de la raíz y del almacenamiento de nutrientes (Magadán Marcos *et al.*, 2011).



### 1.3. Cultivo del lúpulo

El cultivo de *H. lupulus* requiere suelos permeables y profundos para que las raíces puedan desarrollarse adecuadamente. No es muy exigente en suelos, siendo la única limitación si estos son excesivamente arcillosos, ya que la impermeabilidad que se crea puede producir dificultades en el adecuado desarrollo de las raíces (Magadán Marcos *et al.*, 2011; MAPA, 2020b).

Los suelos con pH neutro o ligeramente ácido son los más adecuados, con un pH entre 6 y 6,5 (Magadán Marcos *et al.*, 2011). Es una planta exigente en calcio por lo que prospera mejor en suelos calizos (MAPA, 2020b).

El lúpulo necesita un periodo de dormancia invernal que comienza una vez que ha finalizado el ciclo anual del cultivo, lo que ocurre al final del otoño. Se produce la muerte de la parte aérea y del sistema radicular más fino. La planta permanece así hasta que se dan las condiciones que inducen al inicio de la actividad vegetativa cuando termina el invierno (Magadán Marcos *et al.*, 2011).

Al ser una planta que se reproduce vegetativamente, el rizoma se planta cuando los brotes empiezan a salir al inicio del ciclo del cultivo, a mediados de marzo o principios de abril (Magadán Marcos *et al.*, 2011).

Debido a que de las raíces surgen una gran cantidad de brotes se realiza una poda al inicio del ciclo del cultivo, dejando parte de la cepa al descubierto, cortando los brotes que han surgido y volver



Figura 8. Sistema de alambrada de una plantación de lúpulo. Foto: Sara Mayo Prieto.

a cubrir la cabeza con tierra. Esta operación se realiza para retrasar el ciclo del cultivo y protegerlo de las posibles bajadas de temperatura que puedan dañar los brotes, así como conseguir una uniformidad de las plantaciones (Magadán Marcos *et al.*, 2011).

Al ser una planta trepadora para su cultivo es necesario un sistema permanente de entutorado, conocido coloquialmente como “alambrada” y que está formado por un enrejado reticular de alambre galvanizado sujetado por postes de madera (Figura 8). A principios de mayo, se seleccionan aquellos brotes que tienen un desarrollo intermedio y se les coloca en el tutor enroscándolos en sentido dextroso. Antes de seleccionar los brotes se



colocaran los tutores de material plástico y se les denomina trepas (Magadán Marcos *et al.*, 2011).

Una vez realizado el entutorado, las plantas de lúpulo crecen rápidamente hacia arriba llegando a alcanzar su máximo crecimiento a finales de julio cuando las plantas alcanzan la parte de arriba de las trepas. Después, las plantas comienzan el desarrollo de las ramas laterales lo que finaliza al comienzo de la floración (mediados del mes de julio). Una vez iniciada la floración, que dura aproximadamente 10 días, ocurre la maduración de las flores, momento en el cual se produce un incremento de la lupulina (Magadán Marcos *et al.*, 2011; Lúpulos de León SAT, 2020).

Generalmente el primer año de la plantación no se efectúa riego favoreciendo el desarrollo del sistema radicular. A partir del segundo año se instala un sistema de riego que bien puede ser mediante goteo o por inundación. Normalmente el inicio del riego ocurre cuando las plantas han alcanzado su máximo crecimiento vertical (a finales de junio) (Magadán Marcos *et al.*, 2011).



Figura 9. Peladora de lúpulo en explotación en La Milla del Río (León). Foto: Sara Mayo Prieto.

El momento de la cosecha se produce cuando los conos tienen entre un 75% y un 80% de humedad (desde finales de agosto a finales de septiembre). La cosecha consiste en cortar las plantas a unos 30 cm del suelo. Después se realiza la operación de pelado introduciendo las plantas en una peladora que lo que hará será separar las flores del resto de la planta (Figura 9) (Magadán Marcos *et al.*, 2011).

Con el fin de evitar procesos de fermentación y oxidación que se pueden producir después de la cosecha del lúpulo, se separan las flores de las hojas y tallos en las “peladoras” introduciendo las trepas cosechadas. Una vez realizado el pelado se llevan los conos de lúpulo a unos secaderos donde se deshidratan para facilitar su conservación y transformación y evitar problemas derivados del deterioro de las flores. Los conos deshidratados se enfrían para mantener su color, aceites esenciales y alfa-ácidos. Posteriormente se envasan en balotes semiprensados. Por último se realiza el procesado de las flores que consiste en triturar las flores, pelletizarlas y envasarlas al vacío, ya que la industria cervecera emplea el lúpulo en forma de pellets o en forma de extracto (Magadán Marcos *et al.*, 2011; Lúpulos de León SAT, 2020).



## 1.4. Plagas y enfermedades

El cultivo del lúpulo puede verse afectado por diferentes plagas y enfermedades que provocan una reducción de su desarrollo y como consecuencia de sus producciones, pudiendo causar pérdidas económicas importantes (Lorenzana *et al.*, 2005).

### 1.4.1. *Plagas*

#### *Araña roja*

La araña roja (*Tetranychus urticae* Koch, *T. turkestanii* Ugarov & Nikolskii, *T. evansi* Baker & Pritchard) es un ácaro fitófago de la familia Tetranychidae que es muy polífago y afecta a una gran cantidad de especies de plantas entre ellas el lúpulo (Fauna Europaea, 2020) (Figura 10).



Figura 10. *Tetranychus urticae* sobre hojas de lúpulo. Foto: Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales.

Este ácaro tiene un ciclo de vida corto. Las condiciones óptimas para su desarrollo son temperaturas elevadas y escasa humedad por lo que suele aparecer en el mes de agosto, y tiene una alta capacidad para dispersarse (Porteous Álvarez *et al.*, 2019).

Se alimenta de los contenidos celulares de las hojas y suelen encontrarse en el envés de éstas, normalmente de las hojas más jóvenes, aunque a medida que el ataque avanza se encuentran también en las hojas de las partes altas de las plantas (Porteous Álvarez *et al.*, 2019).



Figura 11. Efectos del ataque de *T. urticae* en una parcela de cultivo de lúpulo. Foto: Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales.



Los primeros síntomas son pequeñas manchas amarillentas en las hojas provocadas por la picadura del ácaro para alimentarse, las cuales se necrosan llegando a pardear la hoja e incluso pudiendo llegar a la defoliación en ataques más severos (Figura 11). En las flores, en primer lugar, aparecen manchas marrones y, posteriormente, se produce una decoloración de éstas (Figura 12). Estos ácaros protegen sus colonias mediante hilos de seda que se pueden encontrar también en el envés de las hojas (Porteous Álvarez *et al.*, 2019). Su ataque ocurre en zonas delimitadas por lo que es muy importante la observación para evitar la expansión del ataque (Magadán Marcos *et al.*, 2011).



Figura 12. Síntomas del ataque de *T. urticae* sobre hojas y conos de lúpulo. Foto: Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales.

### Pulgón



Figura 13. *Phorodon humuli*. Foto: Alicia Lorenzana de la Varga.

El pulgón del lúpulo (*Phorodon humuli* Schrank) (Fauna Europaea, 2020) es un áfido que tiene ciclo dioico, es decir, necesita un hospedador primario y un hospedador secundario (Figura 13). El hospedador primario son plantas del género *Prunus* spp., normalmente el ciruelo (*P. domestica*), el endrino (*P. spinosa*) y el ciruelo ornamental (*P. cerasifera* var. *pisardii*), y el hospedador secundario es el lúpulo (Lorenzana de la Varga *et al.*, 2004; Porteous Álvarez *et al.*, 2019).



Pasa del hospedador primario al hospedador secundario normalmente a finales de mayo instalándose en un primer momento en las partes bajas de las plantas. Realiza varios ciclos sobre el cultivo y regresa a su hospedador primario en otoño donde pasa el invierno (Lorenzana de la Varga *et al.*, 2004; Porteous Álvarez *et al.*, 2019).

Se localizan mayoritariamente en el envés de las hojas, pudiéndose encontrar también en el haz cuando el ataque es severo. Las hojas presentan un color amarillento y se enrollan en los bordes hacia abajo, volviéndose quebradizas e incluso marchitas (Lorenzana de la Varga *et al.*, 2004; Porteous Álvarez *et al.*, 2019).

El pulgón ataca los conos durante su maduración tornándolos a un color marrón e incluso llegando a atrofiarse (Lorenzana de la Varga *et al.*, 2004; Porteous Álvarez *et al.*, 2019) (Figura 14, Figura 15).



Figura 14. *P. humuli* en conos de lúpulo. Foto: Alicia Lorenzana de la Varga.

El ataque del pulgón tiene como consecuencia la deposición de melazas sobre las hojas atacadas sobre las que se instala el hongo fumagina o negrilla, además de la posible transmisión de virus como el Hop mosaic virus (HMV), Hop latent virus (HLV), Hop american latent virus (HALV), Plum pox potyvirus (PPV). La presencia de las melazas y la fumagina en los conos de lúpulo provoca una depreciación del producto comercial (Lorenzana de la Varga *et al.*, 2004; Porteous Álvarez *et al.*, 2019).



Figura 15. Síntomas del ataque de *P. humuli* sobre hojas y conos de lúpulo. Foto: Alicia Lorenzana de la Varga.



#### 1.4.2. Enfermedades

##### *Alternaria del cono*



Figura 16. Vista al microscopio de *Alternaria alternata*. Foto: Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales.

La alternaria del cono (Figura 16) (*Alternaria alternata* Keissl) es un hongo patógeno, perteneciente al filo Ascomycota y clase Dothideomycetes (International Mycological Association, 2020), que provoca que en las puntas de las bractéolas se produzcan decoloraciones marrones-rojizas. Es un patógeno que invade plantas dañadas por lo que, si se han producido daños tanto mecánicos como por la acción

del viento, el ataque es más severo produciéndose estas decoloraciones también en las brácteas. El tejido torna a marrón oscuro lo que provoca que se puedan confundir los síntomas con oídio o mildiu (Figura 17). También se pueden encontrar en el cono estas coloraciones marrón oscuro (Porteous Álvarez *et al.*, 2019).

Este patógeno puede sobrevivir entre tejidos de la planta en descomposición (Lizotte *et al.*, 2019).



Figura 17. Coloraciones marrones en los conos de lúpulo provocadas por *A. alternata*. Foto: Laboratorio de Plagas y Enfermedades Vegetales.



## Mildiu

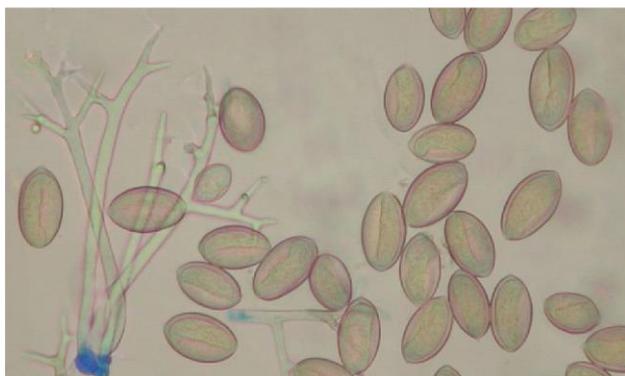


Figura 18. Vista al microscopio de *Peronospora humuli*. Foto: M<sup>a</sup> Piedad Campelo Rodríguez

El mildiu (*Peronospora humuli* Miyabe & Takah) (sinónimo *Pseudoperonospora humuli* GW Wilson) es un patógeno que sólo se desarrolla en el huésped vegetal, además al ser muy específico del huésped sólo se desarrollará sobre el lúpulo. Se trata de un cromista del filo Oomycota y de la clase Oomycetes (International Mycological Association, 2020) (Figura 18).

Afecta a la parte aérea de la planta y provoca un retraso en el crecimiento de los tallos infectados. Las hojas están curvadas hacia abajo, con un color verde-amarillento y aspecto aceitoso en el haz. En el envés de las hojas, en condiciones de alta humedad ambiental, se encuentran masas de esporangios de color marrón-violácea (Campelo Rodríguez *et al.*, 2011) (Figura 19, Figura 20).



Figura 19. Hojas de lúpulo con síntomas de ataque de *P. humuli*. Foto: M<sup>a</sup> Piedad Campelo Rodríguez

Con el avance de la infección, los tejidos afectados se necrosan y aparece alrededor un halo amarillo verdoso (Campelo Rodríguez *et al.*, 2011).

Los tallos de las flores se secan pudiendo inhibir la formación de los conos. Si ya se hubiesen formado éstos presentarían unas manchas marrones e, incluso, podrían

llegar a secarse cayéndose (Campelo Rodríguez *et al.*, 2011).

Se desarrolla sobre la planta cuando se dan temperaturas medias y alta humedad ambiental, por lo que los meses de mayo y junio se debe vigilar el cultivo (Porteous Álvarez *et al.*, 2019).



Figura 20. Amarilleamiento de las hojas de lúpulo provocadas por *P. humuli*. Foto: Sara Mayo Prieto.

### Oídio

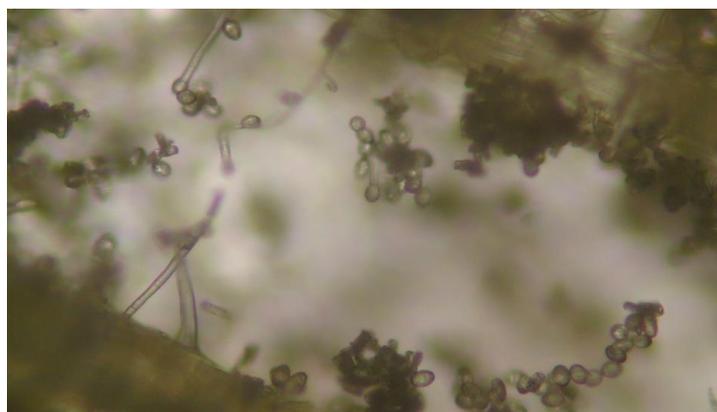


Figura 21. Vista al microscopio de *Sphaerotheca humuli* visto al microscopio. Foto: M<sup>a</sup> Piedad Campelo Rodríguez.

El oídio (*Sphaerotheca humuli* Burrill) es un hongo parásito obligado, lo que significa que necesita a su huésped para completar su desarrollo. Pertenece al filo Ascomycota y a la clase Letiomycetes (International Mycological Association, 2020) (Figura 21).

Afecta a la parte aérea de la planta. Aparecen manchas blancas con esporulación pulverulenta en las hojas en primavera. Más tarde invade los brotes, deforma las flores y atrofia los conos, a medida que la infección avanza las manchas aumentan su tamaño (Figura 22). Cuando los conos maduros son atacados presentan un color rojizo y son quebradizos incluso deshaciéndose en el proceso mecánico, produciéndose así importantes pérdidas (Campelo Rodríguez *et al.*, 2004) (Figura 23).



Figura 22. Manchas pulverulentas del micelio de *S. humuli* sobre hojas y conos de lúpulo. Foto: Sara Mayo Prieto (derecha) y Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales (izquierda).

Se desarrolla rápido con temperaturas de 18 a 25 °C, al contrario que el *mildiu P. humuli*, este hongo no le beneficia la humedad ambiental alta ya que se desarrolla mejor con sequía y viento. Además la lluvia provoca que se limpie el micelio de la planta limitando así su desarrollo y la dispersión de sus esporas (Porteous Álvarez *et al.*, 2019).



Figura 23. Síntomas en hojas y conos de lúpulo del ataque de *S. humuli*. Foto: Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales.

#### *Podredumbre blanca*



Figura 24. Vista al microscopio de *Sclerotinia sclerotiorum*. Foto: Soraya Álvarez Vallejo.

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary es un hongo ascomiceto de la clase Letiomycetes (International Mycological Association, 2020) que provoca la denominada podredumbre blanca sobre los tejidos blandos de la planta huésped. Se producen manchas blancas sobre las que se desarrollan los esclerocios de color negro (Porteous Álvarez *et al.*, 2019) (Figura 24).



Figura 25. Micelio blanco algodonoso de *S. sclerotiorum* en tallos de lúpulo. Foto: M. L. Putnam.

Con temperaturas moderadas y alta humedad, los esclerocios forman un micelio blanco algodonoso que penetra en las plantas a través de heridas, desarrollándose así el hongo sobre la planta (Porteous Álvarez *et al.*, 2019).

También sobre los esclerocios se desarrollan los apotecios, forma sexual del hongo, dentro de los cuales se encuentran las ascas que contienen las ascosporas. Éstas se dispersan fácilmente con el viento depositándose sobre los órganos de las plantas, donde germinan y se desarrollan formando un micelio blanco y algodonoso que daña los órganos de las plantas (Porteous Álvarez *et al.*, 2019) (Figura 25).

#### *Podredumbre gris*

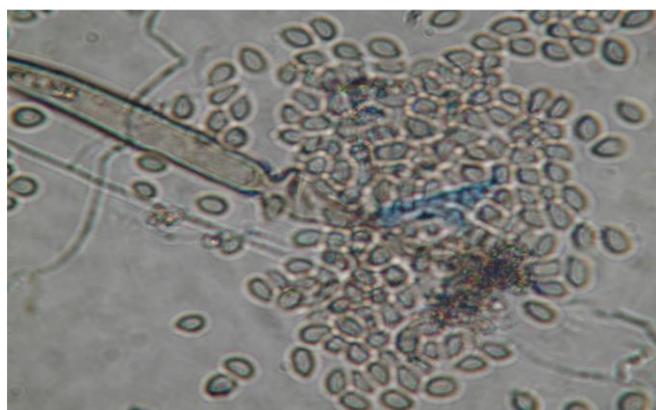


Figura 26. Vista al microscopio de *Botrytis cinerea*. Foto: Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales.

*Botrytis cinerea* Pers. es un hongo patógeno de gran número de especies vegetales entre ellas el lúpulo (filo Ascomycota y clase Letiomycetes) (International Mycological Association, 2020) (Figura 26).



Figura 27 Izquierda: crecimiento de hifas de color gris de *B. cinerea* sobre planta de lúpulo. Foto: Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales. Derecha: oscurecimiento de la punta de un cono de lúpulo provocada por *B. cinerea*. Foto: Sebastien Radisek.



Esta enfermedad es más frecuente con alta humedad relativa y las temperaturas moderadas de entre 17-23 °C, favoreciendo la infección si hay daños en los conos y presencia de agua. Los síntomas son similares a los de *Alternaria* spp. presentándose coloraciones marrones en las brácteas y bractéolas que pueden parecer rayados, pero *Botrytis*, además, provoca el crecimiento de hifas de color gris y aspecto mullido (Porteous Álvarez *et al.*, 2019) (Figura 27).

### Verticilosis

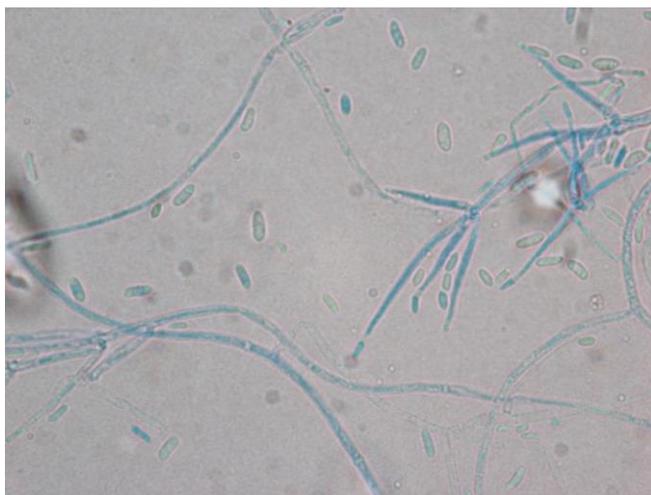


Figura 28. Vista al microscopio de *Verticillium dahliae*. Foto: Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales

La gravedad de la infección de verticilosis causada por (*Verticillium dahliae* Kleb.) (Figura 28) en lúpulo es variable dependiendo de la letalidad de la cepa que causa la infección. Este hongo, del filo Ascomycota y de la clase Sordariomycetes (International Mycological Association, 2020) sobrevive en el suelo y ataca a las plantas de lúpulo a partir de la raíz, invadiendo así el sistema vascular de las plantas. El desarrollo del hongo en la planta provoca una alteración del normal flujo de agua y nutrientes

provocando así su marchitamiento (Porteous Álvarez *et al.*, 2019) (Figura 29).



Figura 29. Síntomas de la invasión de raíces y tallos de plantas de lúpulo por *V. dahliae*. Foto: D. H. Gent (derecha) y Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales (izquierda).



Los síntomas aparecen primero en las hojas bajas de la planta presentando un tejido amarillento y la necrosis entre las venas principales, además de enrollarse hacia arriba. Los tallos se hinchan y cuando se abren presentan un color café (Lizotte *et al.*, 2019).

### *Fusariosis*



Figura 30. Vista al microscopio de *Fusarium* spp. Foto: M<sup>a</sup> Piedad Campelo Rodríguez

*Fusarium* spp. Link. es un género de hongos que causa una amplia gama de enfermedades a un grupo de plantas muy diverso, dentro del cual se encuentra el lúpulo causando pérdidas importantes en los cultivos. Las especies de *Fusarium* producen una variedad de micotoxinas de las cuales las más importantes son las fumosinas, los tricotecenos y la zearalenona, aunque no todas las especies

producen todas las toxinas (Alves-Santos y Diez, 2011).

*Fusarium* spp. produce conidios en forma de canoa o media luna con una célula basal en forma de pie (Figura 30). Pueden formar 3 tipos de esporas diferentes: macroconidias, microconidias y clamidiosporas. Las macroconidias tienen diferentes formas y tamaños. Se producen en esporodocios, que en campo aparecen como grumos anaranjados o rosados en el sustrato sobre el que crece el hongo. Los microconidios son mucho más pequeños y en cultivos suelen producirse en el micelio aéreo. Estos no son producidos por todas las especies de *Fusarium* y su presencia o ausencia sirve para el diagnóstico. Pueden producirse en cadenas, y estar adaptadas para la dispersión aérea o por insectos, y en los taxones que producen marchitez vascular para moverse a través de xilema. Las clamidiosporas son esporas de supervivencia que son producidas por muchas especies de este hongo, transmitidas por el suelo como medio para sobrevivir en aquellos periodos en los que no hay sustrato disponible o en los que las condiciones ambientales no favorecen el crecimiento del hongo. Estas esporas tienen paredes gruesas y pueden producirse individualmente, en grupos y en cadenas en el micelio o en el macroconidio (Alves-Santos y Diez, 2011).

El hongo patógeno es *Fusarium* y su teleomorfo que es *Gibberella* Sacc. cuya clasificación taxonómica es la siguiente (International Mycological Association, 2020):



- Reino: Fungi
- Subreino: Dikarya
  - División: Ascomycota
  - Subdivisión: Pezizomycotina
    - Clase: Sordariomycetes
    - Subclase: Hypocreomycetidae
      - Orden: Hypocreales
        - Familia: Nectriaceae
          - Género: *Fusarium* Link

El género *Fusarium* causa marchitamientos vasculares ampliamente distribuidos (Figura 31). Se manifiestan con un marchitamiento más o menos rápido, oscurecimiento y muerte de hojas y vástagos suculentos de algunas plantas. Los marchitamientos se producen por la presencia y actividad del patógeno en los tejidos vasculares xilémicos de las plantas. En pocas semanas el patógeno puede ocasionar la muerte de la planta o de las partes de la misma que están por encima del punto de invasión. El patógeno se propaga en forma de micelio o conidios a través del xilema y, cuando la planta muere, se propaga hacia otros tejidos y esporula en la planta muerta o sobre su superficie (Agrios, 2002).



Figura 31. Síntomas en rizoma y tallos de lúpulo de la infección *Fusarium* spp. Foto: Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales.

Las hojas de las plantas infectadas se debilitan y presentan una tonalidad de verde claro al amarillo verdoso, decaen y se marchitan tornando a un color amarillo y finalmente pardean y mueren. En los tallos y ramas infectados en cortes transversales presentan zonas color café dispuestas en un anillo completo o interrumpido (Agrios, 2002).



*F. oxysporum* Schltdl. es una especie anamorfa con considerable variación morfológica y fisiológica que tiene la capacidad de causar enfermedades en plantas hospedantes económicamente importantes (Alves-Santos *et al.*, 1999).

El micelio aéreo es incoloro al principio, cuando madura torna a un color crema o amarillo pálido, y puede adquirir una tonalidad rosa pálido o algo purpura (Figura 32). Produce tres tipos de esporas asexuales. Las microconidias son las esporas que el hongo forma con mayor abundancia y frecuencia y se forman en el interior de los vasos de las plantas hospedantes, tienen de una a dos células. Las macroconidias que tienen de 3 a 5 células, se adelgazan gradualmente y se encorvan hacia ambos extremos, se encuentran generalmente en la superficie de las plantas que han sido destruidas por el patógeno. Las clamidiosporas que están formadas por una o dos células, con pared gruesa y tienen forma redondeada (Agrios, 2002) y pueden ser individuales o estar agrupadas en cadenas cortas (Melgarejo Nárdiz *et al.*, 2010).

A menudo los aislados de este patógeno muestran un alto grado de especificidad en sus huéspedes y puede subdividirse en formas especiales basadas en las especies de las que es patógeno. La reproducción sexual en este hongo es poco frecuente llegando incluso a no darse (Alves-Santos *et al.*, 1999).

En el año 2002 se comprobó que varias especies de *Fusarium*, entre las que se encuentra *F. oxysporum*, eran las responsables de la clorosis foliar y el marchitamiento en plantaciones de lúpulo en Yugoslavia. Se observó que las partes subterráneas de las plantas estaban cubiertas de un micelio blanco. En primer lugar, los hongos colonizan las partes subterráneas de las plantas y la parte basal del tallo, desde donde se dispersan y atacan los tejidos vasculares. Además, se interrumpe la circulación de agua y nutrientes en la planta causando clorosis, necrosis y marchitamiento de las hojas apicales y más tarde de las hojas inferiores. Las trepas infectadas son más finas y se desprenden fácilmente de las partes subterráneas (Sabo *et al.*, 2002).

*F. oxysporum* produce síntomas aéreos que en primer lugar causan un amarilleamiento progresivo de las hojas, a menudo unilateral en el inicio de la enfermedad, junto con una pérdida de color en las nerviaciones que acaba provocando la necrosis total o parcial del limbo. El otro síntoma aéreo que provoca es el marchitamiento de las hojas apareciendo estas secas y con un aspecto gris-verdoso. También pueden aparecer oscurecimientos en el tejido leñoso e incluso en el parénquima



cortical subyacente, presentando en ocasiones una estría pardo-marrón en el exterior de los tallos sobre la que crece el cuerpo fructífero del hongo (Tello Marquina y La Casa Plasencia, 1990).

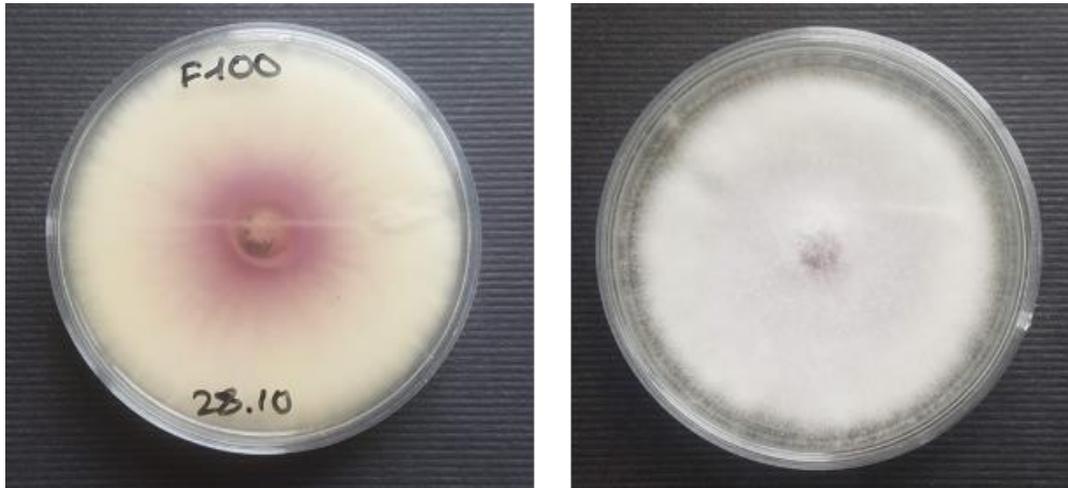


Figura 32. *Fusarium oxysporum* en medio de cultivo Patata-Dextrosa-Agar (PDA). Foto: Elaboración propia.

Otra especie de *Fusarium* que afecta al lúpulo es *F. culmorum* (Wm. G. Smith) Saccardo (Figura 33). Se trata de un hongo anamorfo que forma macroconidias curvadas, con 3-5 septos, fusoides y con la célula apical constreñida en su centro. Miden 26-40 x 4-6  $\mu\text{m}$  y se producen en monofiálidas sobre micelio de crecimiento muy rápido de color amarillo-rojizo. No produce microconidias. Las clamidiosporas, principalmente intercalares, son ovales y de color pardo. El hongo penetra en las plantas muy jóvenes a través del hipocotilo o las raíces y las destruye. En las plantas adultas infecta la base del tallo causando marchitez, pardeamientos y secas de la planta (Melgarejo Nárdiz *et al.*, 2010).

Este hongo patógeno causa la pudrición del tallo y la raíz en las plantas provocando decoloraciones marrones y su muerte.

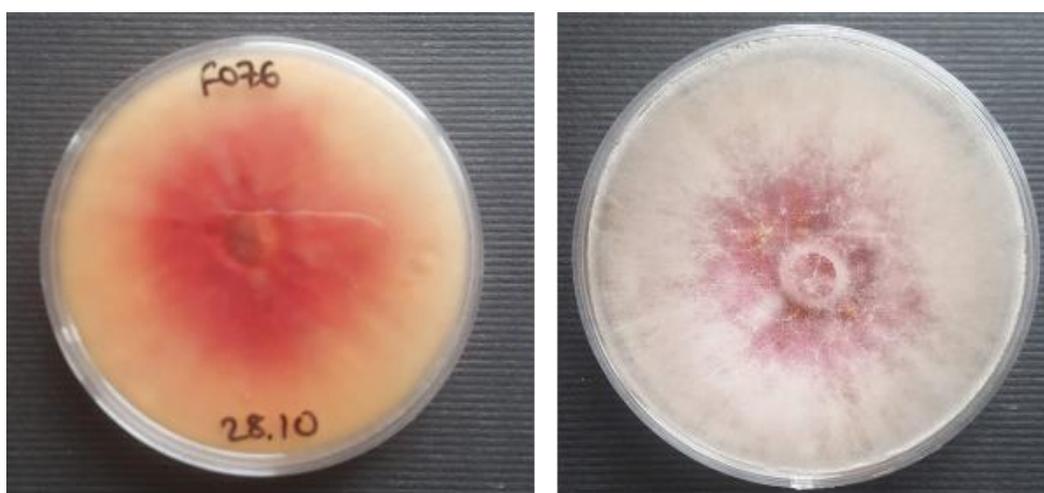


Figura 33. *Fusarium culmorum* en medio de cultivo Patata-Dextrosa-Agar (PDA). Foto: Elaboración propia



También se encontró en el año 2002 en Yugoslavia que *F. culmorum* causaba clorosis foliar y marchitamiento de las plantas de lúpulo al igual que *F. oxysporum*. Si bien es cierto que se comprobó que éste era menos patógeno (Sabo *et al.*, 2002).

Otra especie de *Fusarium* que causa chancros en las plantas de lúpulo es *F. sambucinum* Fuckel (Figura 34). Produce macroconidios cortos, robustos, de curvatura moderada a extraña con paredes celulares gruesas y una célula apical fuertemente curvada. Raramente produce microconidios. Las clamidiosporas son abundantes y se forman rápidamente en cadenas, grupos o individualmente. El crecimiento del micelio es rápido en medio de cultivo patata-dextrosa-agar y generalmente tiene un micelio aéreo denso de color rosado, marrón rojizo, blanco o tostado. Las esporodocias son cremosas, tostadas o anaranjadas cuando están presentes (Ocamb y Bienapfl, 2009).

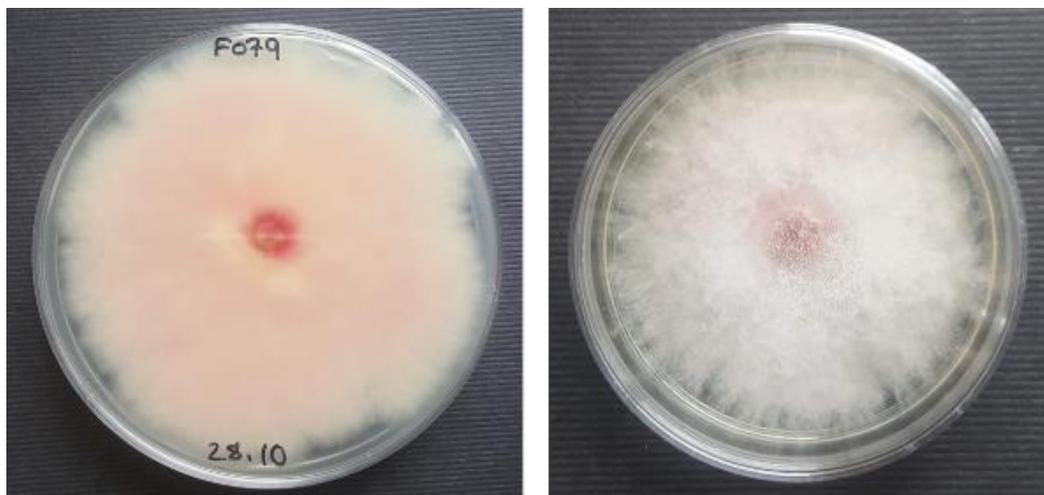


Figura 34. *Fusarium sambucinum* en medio de cultivo Patata-Dextrosa-Agar (PDA). Foto: Elaboración propia.

Las trepas afectadas por este patógeno se marchitan rápidamente, siendo frecuente durante la floración o en condiciones de temperaturas elevadas. Las hojas pueden mostrar clorosis. Las bases de las trepas afectadas suelen estar hinchadas debido a que se interrumpe el transporte de sustancias fotosintéticas a través del floema (Figura 31). La hinchazón se contrae cerca de la corona y puede consistir en solo unos pocos elementos vasculares. Las trepas afectadas se desprenden fácilmente de la corona y en ocasiones también tienen una división longitudinal en el área cortical colonizada. Por lo general se encuentra una decoloración marrón en el tejido cortical afectado de las trepas infectadas. También pueden formarse chancros en los rizomas de las plantas afectadas. Una corona infectada puede morir por completo o presentar un crecimiento atrofiado y poco productivo. La enfermedad es más severa con suelos húmedos o después de inviernos húmedos (Ocamb y Bienapfl, 2009; Lizotte *et al.*, 2019)



*F. sambucinum* también puede provocar necrosis en las brácteas y bractéolas, afectadas a medida que el cono se acerca a la madurez completa, empezando por la punta del cono. La enfermedad es más severa, si durante la fase de desarrollo del cono, se dan condiciones de alta humedad, rocío o lluvia (Ocamb y Bienapfl, 2009; Gent *et al.*, 2010) (Figura 35).



Figura 35. Síntomas provocados por *F. sambucinum* en los conos de lúpulo. Foto: D. H. Gent, S. J. Pethybridge.

*Fusarium* spp. inverna en el suelo o en restos de plantas en forma de clamidiosporas. Es un organismo saprófito y, una vez que se introduce en un terreno de cultivo, se establece por un tiempo indefinido, aunque su población varía considerablemente en función de la susceptibilidad y el tiempo de cultivo de la planta hospedante. La propagación del hongo es en forma de micelio a través del agua del suelo, equipos agrícolas, transplantes, semillas, esquejes de plantas infectadas y en algunos casos en forma de esporas transportadas por el viento (Agrios, 2002).



Figura 36. Desarrollo de micelio de *Fusarium* spp sobre el tallo de lúpulo. Foto: D. H. Gent.

Las enfermedades producidas por este patógeno pertenecen al grupo de fitopatologías más difíciles de controlar. Debido a su forma de infección, ya que con una sola espora la planta puede infectarse, es difícil la prevención y el control con un producto fungicida de contacto. Además, al ser un hongo saprófito, hace que la rotación de cultivos y otras medidas culturales no tengan eficacia para el control de este patógeno. Una de las medidas más eficaces para su control es la utilización de variedades resistentes y también la aplicación de fungicidas sistémicos (Agrios, 2002). Es muy importante evitar o minimizar las heridas en las plantas, utilizando la poda química cuando sea necesario (Lizotte *et al.*, 2019).



### 1.5. Control de fitopatógenos en el cultivo del lúpulo

Para la prevención y la curación de plantas que son atacadas por un fitopatógeno se pueden llevar a cabo diferentes medidas. Se pueden emplear productos de síntesis química, organismos con actividad antagónica, métodos culturales y otros. Debido a la Reforma de la Política Agraria Común (PAC) se ha reducido el número de productos fitosanitarios de síntesis química autorizados con el fin de que prevalezca la seguridad alimentaria, así como que sea sostenible a largo plazo. Por ello se propone dar prioridad a los métodos no químicos descritos en producción integrada, cultivos ecológicos, y otros.

Para el control de fitopatógenos en lúpulo son muy importantes medidas como la utilización de cultivares resistentes, la aplicación de medidas de saneamiento tales como la utilización de un material vegetal sano y la eliminación de las plantas muy afectadas, llevar a cabo medidas culturales que reduzcan los periodos de humedad, la eliminación de las hojas basales de las plantas y la aplicación de fungicidas en los momentos oportunos (Magadán Marcos *et al.*, 2011). En ocasiones la aplicación de productos fungicidas en el año de implantación del cultivo puede ayudar a reducir la infección de la corona y los niveles de enfermedad en años posteriores (Gent *et al.*, 2010). Se debe tener en cuenta la aparición de resistencias a los fungicidas empleados, por lo que es recomendable realizar un buen manejo de los mismos y evitar la repetición del uso de un producto fungicida (Ocamb y Bienapfl, 2009).

Para la prevención de las fitopatologías también es importante la selección óptima de procedimientos agronómicos tales como el riego y el manejo de fertilizantes para mejorar la productividad de las plantas y reducir la susceptibilidad. La prevención puede ser un método muy eficaz, además de rentable (Gent *et al.*, 2010).

Según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación actualmente están autorizados 64 productos fitosanitarios para el control de fitopatologías en lúpulo, de los cuales ningún producto está autorizado para el control de *Fusarium* spp. (MAPA, 2020c).

Es por ello que para el control de este hongo patógeno en el cultivo del lúpulo son fundamentales las medidas culturales tales como reducir la humedad en la corona, la eliminación de los tejidos enfermos para evitar la propagación del hongo, aplicación equilibrada de abonados nitrogenados que pueden reducir la influencia del patógeno. Una labor importante es aplicar medidas para favorecer el crecimiento de raíces sanas, ya que al ser un hongo saprofito infecta a las plantas a través de las raíces. Se debe evitar cualquier lesión en las plantas tanto mecánicas producidas por el manejo del cultivo como las lesiones provocadas por plagas, ya que al igual que las raíces este es otro medio de entrada de *Fusarium* spp. (Gent *et al.*, 2010). Para evitar las lesiones se debe reducir el



movimiento de las trepas mediante operaciones como el arqueamiento o la orientación en hileras (Ocamb y Bienapfl, 2009).

El uso de fungicidas peligrosos para el control de enfermedades en las plantas es cada vez más un motivo de preocupación en muchos países del mundo, lo que ha llevado a la investigación sobre métodos más seguros y respetuosos con el medio ambiente. La utilización de productos biológicos para disminuir las enfermedades, reduciendo así la pérdida de cultivos, es una alternativa que no conlleva peligros (Chet y Inbar, 1994).

En el año 2018 fueron comercializadas en España 38.095 t de productos fitosanitarios fungicidas y bactericidas, de los cuales los fungicidas inorgánicos representan un 85,6 %. Sin embargo solamente un 0,07 % de estos productos fueron productos biológicos o agentes de control biológico, si bien es cierto que la comercialización de estos productos ha ido en aumento en los últimos años siendo en 2011 solamente un 0,003 % de los productos fungicidas y bactericidas comercializados (MAPA, 2020a).

El control biológico consiste en el empleo de organismos beneficiosos o sus productos que se alimentan o parasitan organismos patógenos para las plantas o que compiten con éstos desplazándolos. Estos organismos están disponibles comercialmente para su liberación en los cultivos tanto para su incorporación como para incrementar el número de enemigos naturales o agentes de biocontrol (Gent *et al.*, 2010).

El empleo de agentes de control biológico u organismos distintos al hombre con capacidad de reducir la población del agente causante de la enfermedad o evitar sus efectos podría ser una forma sostenible para el control de fitopatógenos en el cultivo del lúpulo (Hjeljord y Tronsmo, 1998). Dichos agentes se pueden emplear solos o bien junto con dosis reducidas de fungicidas químicos para poder controlar a los patógenos que afecten a la planta y así reducir al mínimo el impacto sobre el medio ambiente (Chet y Inbar, 1994). Existen formulaciones de agentes biológicos formados por bacterias, como *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Bacillus*, y por hongos, como *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Ampelomyces*, *Candida* y *Coniothyrium*. Se han patentado y comercializado diferentes productos comerciales para el control de enfermedades vegetales con estas formulaciones de agentes biológicos (Tabla 2).



Tabla 2. Agentes de biocontrol autorizados para el control de hongos fitopatógenos (MAPA, 2020c).

Materia activa	Nombre comercial	Control/ efectos	Casa comercial
<i>Ampelomices quisqualis</i> M10	AQ 10	<i>Sphaerotheca</i> spp.	CBC IBERIA S.A.U. (España)
<i>Aureobasidium pullulans</i> DSM 14940 y DSM 14941 50%	BOTECTOR	<i>Botrytis</i> spp.	BIO-FERM GMBH (Austria)
<i>A. pullulans</i> DSM 14940 y DSM 14941 25%	BLOSSOM PROTECT	<i>Botrytis</i> spp. <i>Penicilium</i> spp. <i>Pezizula</i> spp. <i>Erwinia amylovora</i>	BIO-FERM GMBH (Austria)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB24	TAEGRO	<i>Pseudoperonospora</i> spp. <i>Sphaerotheca</i> spp. <i>Alternaria</i> spp. <i>Botrytis</i> spp. <i>Sclerotinia</i> spp. <i>Botrytis cinerea</i>	NOVOZYMES FRANCE S.A.S (Francia)
<i>B. amyloliquefaciens</i> MBI 600	SERIFEL	<i>B. cinerea</i> <i>Trichoderma</i> spp. <i>Sclerotinia</i> spp.	BASF ESPAÑOLA S.L.U. (España)
<i>B. amyloliquefaciens</i> subesp. <i>plantarum</i>	AMYLO-X WG	<i>Sclerotinia</i> spp. <i>Sphaerotheca</i> spp. <i>Monilia</i> spp. <i>Pseudomona</i> spp. <i>Botrytis</i> spp. <i>E. amylovora</i> <i>Stemphylium</i> spp.	MITSUI AGRISCENCE INTERNATIONAL S.A./N.V (Bélgica)
<i>B. pumilus</i> QST 2808	SONATA	<i>Sphaerotheca</i> spp.	BAYER CROPSCIENCE S.L. (España)
<i>B. subtilis</i>	SERENADE AS	<i>Botrytis</i> spp.	BAYER CROPSCIENCE S.L. (España)
<i>B. subtilis</i> QST 713	SERENADE ASO SERENADE MAX	<i>Monilia</i> spp. <i>Colletotrichum</i> spp. <i>Xanthomonas</i> spp. <i>Botrytis</i> spp. <i>Sphaerotheca</i> spp. <i>Sclerotinia</i> spp. <i>Rhizoctonia</i> spp. <i>Alternaria</i> spp. <i>Fusarium</i> spp. <i>E. amylovora</i> <i>Mycosphaerella</i> spp. <i>Stemphylium</i> spp. <i>Cercospora</i> spp.	BAYER CROPSCIENCE S.L. (España)
<i>Candida oleophila</i> CEPA 0	NEXY	<i>Botrytis</i> spp.	BIONEXT SPRL (Bélgica)
<i>Coniothyrium minitans</i>	CONTANS WG	<i>Sclerotinia</i> spp.	BAYER CROPSCIENCE S.L. (España)
<i>Gliocladium catenulatum</i> CEPA J1446	PRESTOP	<i>Phytium</i> spp. <i>Phytophthora</i> spp. <i>Rhizoctonia</i> spp. <i>Fusarium</i> spp. <i>Botrytis</i> spp. <i>Didymella bryoniae</i>	DANSTAR FERMENT AG (Suiza)



Tabla 2. Agentes de biocontrol autorizados para el control de hongos fitopatógenos (MAPA, 2020c) (continuación).

Materia activa	Nombre comercial	Control/ efectos	Casa comercial
<i>Pythium oligandrum</i>	POLYVERSUM	<i>Botrytis</i> spp. <i>Sclerotinia</i> spp. <i>Sphaerotheca</i> spp.	AGRICHEM S.A. (España)
<i>Saccharoyces cerevisiae</i>	JULIETTA	<i>Monilia</i> spp. <i>Botrytis</i> spp.	AGRAUXINE S.A. (Francia)
<i>Trichoderma asperellum</i> + <i>T. gamsii</i>	BLINDAR	<i>Sclerotinia</i> spp. <i>Phytophthora</i> spp. <i>Rhizoctonia</i> spp. <i>Verticilium</i> spp. <i>Armillaria</i> spp.	ISAGRO S.P.A. (Italia)
<i>T. asperellum</i> + <i>T. gamsii</i>	BIOTEN	<i>Phytophthora</i> spp. <i>Pythium</i> spp. <i>Sclerotinia</i> spp. <i>Verticilium</i> spp.	ISAGRO ESPAÑA S.L. (España)
<i>T. asperellum</i> + <i>T. gamsii</i>	REMEDIER	<i>Phytophthora</i> spp. <i>Pythium</i> spp. <i>Sclerotinia</i> spp.	ISAGRO S.P.A. (Italia)
<i>T. asperellum</i> + <i>T. atroviride</i>	TUSAL	<i>Phytophthora</i> spp <i>Fusarium</i> spp. <i>Rhizoctonia</i> spp. <i>Pythium</i> spp. <i>Sclerotinia</i> spp.	TIMAC AGRO ESPAÑA S.A. (España)
<i>T. asperellum</i>	T34 BIOCONTROL	<i>Pythium aphanidermatum</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	BIOCONTROL TECHNOLOGIES S.L. (España)
<i>T. asperellum</i>	XEDAVIR	Hongos de suelo	XEDA ITALIA S.R.L. (Italia)
<i>T. atroviride</i>	VINTEC	<i>Botrytis</i> spp. <i>Sclerotinia</i> spp. <i>Fomitiporia mediterranea</i>	BIPA N.V. (Bélgica)
<i>T. atroviride</i> (CEPA I-1237)	TRI-SOIL	<i>Fusarium</i> spp. <i>Rhizoctonia</i> spp. <i>Sclerotinia</i> spp.	AGRAUXINE S.A. (Francia)
<i>T. atroviride</i> (CEPA I-1237)	ESQUIVE WP	<i>Fomitiporia mediterranea</i> <i>Eutypa lata</i>	AGRAUXINE S.A. (Francia)
<i>T. harzianum rifai</i> (CEPA T-22)	TRIANUM P TRIANUM G	<i>Pythium</i> spp. Enfermedades fúngicas	KOPPERT B.V. (Holanda)

### 1.6. Agentes de control biológico: *Trichoderma* spp.

*Trichoderma* spp. es un género de ascomicetes filamentosos que se encuentra entre los hongos saprofitos más aislados. Aparecen con frecuencia en el suelo y crecen sobre madera, corteza, otros hongos y muchos sustratos, teniendo un alto potencial oportunista y una gran adaptabilidad a diversas condiciones ecológicas (Kubicek y Harman, 2002).



### 1.6.1. Taxonomía y morfología de *Trichoderma*

El género *Trichoderma* fue definido en 1794 por Persoon, pero no fue hasta el siglo XX cuando se empezó a estudiar al llamar la atención de los agricultores y comprobar que era capaz de controlar hongos que causaban enfermedades en las plantas (Weindling, 1932, 1934; Mukherjee *et al.*, 2013). Se ha definido su taxonomía como (Samuels, 1996):

- Reino: Fungi
- Subreino: Dikarya
  - División: Ascomycota
  - Subdivisión: Pezizomycotina
    - Clase: Sordariomycetes
    - Subclase: Hypocreomycetidae
      - Orden: Hypocreales
        - Familia: Hypocreaceae
          - Género: *Trichoderma* Persoon, Fries

En la actualidad se han definido 256 especies de este género (Bissett *et al.*, 2015).

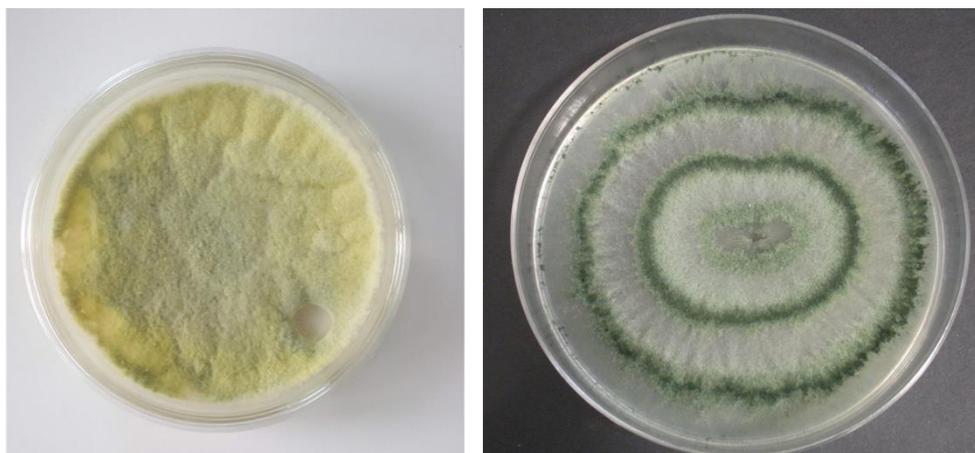


Figura 37. Diferentes aislados de *Trichoderma* en medio de cultivo Patata-Dextrosa-Agar (PDA).

Foto: Elaboración propia (izquierda), Sara Mayo Prieto (derecha).

*Trichoderma* spp. es un hongo ascomicete de la familia Hypocreae cuyo teleomorfo es *Hypocrea* spp. Es un hongo imperfecto, ya que no tiene etapa de reproducción sexual conocida. Este género de hongos se caracteriza por presentar un crecimiento rápido, la presencia de conidios de color verde brillante principalmente (Figura 37), elevada producción de esporas y una estructura conidiofora ramificada (Figura 38). Las clamidiosporas de *Trichoderma* tienden a ser globosas o subglobosas. Es un hongo ubicuo y simbionte oportunista, que se encuentra principalmente en el suelo pero también en



restos vegetales y en madera vieja (Samuels, 1996; Howell, 2003; Benítez *et al.*, 2004; Schmoll y Schuster, 2010; Saba *et al.*, 2012).

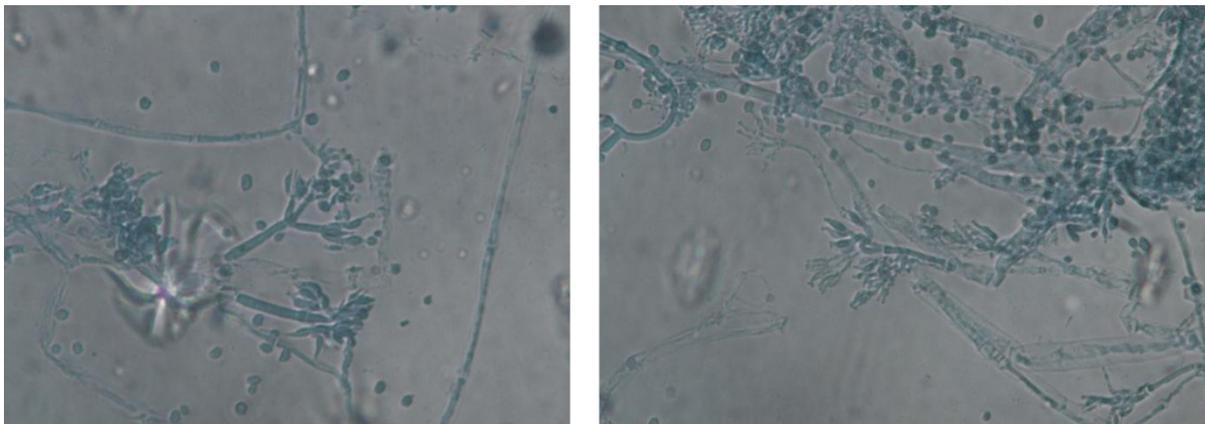


Figura 38. Vista al microscopio de *Trichoderma* spp. Foto: Elaboración propia.

*Trichoderma* es un agente de biocontrol con la capacidad de establecerse en diferentes patosistemas produciendo efectos moderados en el equilibrio del suelo y sin efectos negativos sobre los organismos beneficiosos que contribuyen al control de patógenos.

Tiene cada vez más importancia en la agricultura sostenible como agente de biocontrol debido a su capacidad competitiva frente a otros hongos y sus efectos positivos sobre las plantas. Los mecanismos utilizados por este hongo para el control biológico son complejos y se producen sinergias entre ellos para obtener como resultado un biocontrol eficiente. El éxito de *Trichoderma* como control biológico se debe a su alta capacidad reproductiva y de supervivencia en condiciones desfavorables, eficiencia en el aprovechamiento de nutrientes, capacidad para modificar la rizosfera, fuerte agresividad frente a hongos fitopatógenos y la inducción al crecimiento vegetal y los mecanismos de defensa de las plantas. Entre los mecanismos que utiliza *Trichoderma* para el control biológico de hongos patógenos destacan la producción de enzimas hidrolíticas y antibióticos, el micoparasitismo, la competencia por los nutrientes y por espacio y la producción de metabolitos. Controlan hongos ascomicetos, basidiomicetos y deuteromicetos que son principalmente patógenos de suelo (Benítez *et al.*, 2004; Saba *et al.*, 2012).

Las especies de *Trichoderma* más utilizadas como agentes de biocontrol son *T. virens*, *T. viride* y sobre todo *T. harzianum* (Benítez *et al.*, 2004). *T. harzianum* ha sido utilizado para el control de varias enfermedades tanto solo como combinado con otras especies de *Trichoderma* o adyuvantes químicos (Samuels, 1996). El éxito de *Trichoderma* como agente de biocontrol se debe a la combinación de mecanismos micoparasitos muy activos con estrategias de defensa inducidas en las plantas (Saba *et al.*, 2012).



Como simbiote oportunista, *Trichoderma* está asociado a las raíces de las plantas, y por ello para que el control biológico tenga lugar las raíces tienen que ser colonizadas por el hongo y así el hongo penetra en la planta. *Trichoderma* crece fácilmente con el sistema radicular de las plantas ya sea cuando es aplicado directamente al suelo o mediante tratamientos a las semillas (Howell, 2003). Los tratamientos a las semillas de las plantas pueden tener efectos positivos tanto a corto como a largo plazo en las semillas y en el rendimiento de las plantas (Saba *et al.*, 2012). Las plantas producen metabolitos, tales como fitoalexinas, flavonoides y terpenoides, derivados fenólicos, agliconas y otros compuestos antimicrobianos, ante la presencia de un organismo extraño. *Trichoderma* es más resistente a estos metabolitos que otros hongos lo cual le aporta una ventaja para permanecer en la planta. *Trichoderma* es resistente a muchos compuestos tóxicos, incluyéndose herbicidas, fungicidas y pesticidas, por lo que crecen rápidamente cuando se inoculan en el suelo (Benítez *et al.*, 2004). El hongo coloniza la rizosfera estableciéndose rápidamente en la comunidad microbiana que hay en ella. También controla al patógeno y compite o reduce la microflora empleando distintos mecanismos. Tiene efectos sobre las plantas que pueden contribuir a la resistencia de estas frente a enfermedades. Estos efectos se traducen en el crecimiento de raíces y brotes en las plantas, resistencia a estrés y cambios en el estado nutricional de las plantas (Howell, 2003).

Otro de los mecanismos utilizados por *Trichoderma* es la competencia con otros hongos por el espacio y los nutrientes, ya que coloniza el suelo y partes de la planta impidiendo así que los patógenos se desarrollen, además de reducir la disponibilidad de nutrientes necesarios para su desarrollo. La escasez de nutrientes es una de las principales causas de la muerte de microorganismos, por lo que la competición por nutrientes es un mecanismo interesante para el control biológico de patógenos fúngicos. Nutrientes como el hierro son importantes para los hongos filamentosos, *Trichoderma* produce sideróforos que quelan el hierro provocando que no esté disponible para los hongos patógenos y por lo tanto se detiene su crecimiento. La sensibilidad de muchos patógenos a la falta de nutrientes junto con la eficacia de *Trichoderma* en el uso de los nutrientes disponibles, tiene como consecuencia un buen resultado en el control de fitopatógenos. A medida que disminuye la concentración de nutrientes necesarios para el desarrollo de los patógenos en el suelo, el biocontrol es más eficaz (Benítez *et al.*, 2004).

Otra de las características de este género de hongos es su capacidad para parasitar otros hongos. El micoparasitismo conlleva el contacto físico entre los organismos e implica cambios morfológicos tales como enrollamiento y formación de estructuras similares a un aprensorio que sirven para penetrar en el huésped. Tiene como consecuencia la reducción del crecimiento y desarrollo de los hongos patógenos, llegando a provocar la muerte del hongo parasitado. *Trichoderma* sintetiza enzimas como quitinasas y  $\beta$ -1,3- glucanasas que degradan polisacáridos, quitina y glucanos de la



pared celular de los hongos, destruyéndola y facilitando la parasitación (Howell, 2003; Benítez *et al.*, 2004; Saba *et al.*, 2012).

La mayoría de especies de *Trichoderma* producen metabolitos tóxicos volátiles como el ácido harziánico, gliotoxina, tricholina, viridina, gliovirina y otros, que impiden la colonización de microorganismos antagónicos (Benítez *et al.*, 2004).

En el control de *S. sclerotiorum*, *Trichoderma* no sólo inhibe el crecimiento del patógeno sino que también lo parasita colonizando las hifas e inhibiendo la germinación de esclerocios demostrando así su potencial como agente de biocontrol (Mansour *et al.*, 2008).

Por ejemplo, en el control de *B. cinerea* se ha demostrado que las proteasas producidas por *T. harzianum* inactivan las enzimas hidrolíticas del patógeno en las hojas de alubia. Se ha demostrado que *T. harzianum*, produce proteasas, antagonistas efectivas frente a *F. culmorum* y *Rhizoctonia solani*. El efecto de las enzimas junto con metabolitos secundarios sintetizados por el agente de biocontrol inhibe la tasa de crecimiento de patógenos como *B. cinerea* hasta en un 30% (Benítez *et al.*, 2004)

Sivan y Chet (1993) comprobaron la capacidad de *T. harzianum* como agente de control frente a *F. oxysporum* en tomate, incluso aumentando los rendimientos.

Aislados de *F. culmorum* de cultivos de arroz en Valencia fueron parasitados por *T. harzianum*. Se comprobó que el agente de biocontrol provocaba una deformación de las hifas del patógeno debido a la secreción de metabolitos con lo que inhibió el crecimiento del fitopatógeno (Sempere Ferre y Santamarina, 2010). También han controlado enfermedad causada por *Pythium* spp. *B. cinerea*, *Rhizoctonia* spp. y *Fusarium* spp. (Saba *et al.*, 2012).

*T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* y *T. longibrachiatum* también han demostrado su capacidad de biocontrol sobre el patógeno *F. sambucinum* en patata, siendo *T. longibrachiatum* el que tuvo mayor capacidad de inhibición del patógeno (Zhang y Wang, 2012).



## 2. OBJETIVOS

El cultivo del lúpulo se ve afectado por varias enfermedades que causan importantes reducciones de la producción y la calidad de los conos, acarreado pérdidas económicas significativas. Si bien es cierto que las enfermedades más relevantes, y por lo tanto las más estudiadas, son el mildiu y el oídio, en los últimos años *Fusarium* spp. está causando daños importantes en especial en nuevas variedades, que si bien son productivas y de gran calidad, presentan susceptibilidad a este patógeno.

En la actualidad el control de este patógeno se basa fundamentalmente en medidas culturales enfocadas en mayor medida a la prevención de la enfermedad. Según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no hay ningún producto fitosanitario autorizado para el control de *Fusarium* spp. en el cultivo del lúpulo. Por este motivo se hace necesario el estudio de alternativas eficaces y sostenibles, como el control biológico.

Numerosos estudios demuestran que el agente de biocontrol *Trichoderma* tiene capacidades para el control del patógeno objeto de estudio en multitud de cultivos. Por ello se realizan ensayos *in vitro* para evaluar la capacidad de inhibición de *Trichoderma* sobre tres especies de *Fusarium* que provocan daños en lúpulo, *F. culmorum*, *F. sambucinum* y *F. oxysporum*.

Este trabajo tiene como objetivos:

- Recolectar e identificar los aislados de *Fusarium* que afectan al lúpulo en León.
- Recolectar e identificar los aislados de *Trichoderma* autóctonos de lúpulo en León.
- Evaluar la capacidad de inhibición *in vitro* de los aislamientos autóctonos de *Trichoderma* sobre el desarrollo de los aislamientos de *Fusarium* con el fin de establecer las bases de un método de control efectivo y sostenible para incrementar el rendimiento del cultivo del lúpulo.



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Obtención de aislados

Se realizó un muestreo de campo (Figura 39) donde se recogieron muestras de diferentes puntos de la parcela tanto de suelo como de rizoma en cada una de las parcelas objeto de estudio (Tabla 3). Las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta su procesado.



Figura 39. Recogida de muestras de suelo y rizoma en parcelas de cultivo de lúpulo. Foto: Sara Mayo Prieto.

Tabla 3. Parcelas seleccionadas para el muestreo.

Municipio	Localidad	Polígono	Parcela	Variiedad	Tipo muestra	Observaciones
Santa Marina del Rey	Santa Marina del Rey	806	379	Columbus	Rizoma	Marcas rosas en las raíces - Posible presencia de <i>Fusarium</i>
					Suelo	
Benavides de Órbigo	Gavilanes del Órbigo	106	120	Columbus	Rizoma	Marcas rosas en las raíces - Posible presencia de <i>Fusarium</i>
					Suelo	
Benavides de Órbigo	Gavilanes del Órbigo	106	123	Columbus	Rizoma	Marcas rosas en las raíces - Posible presencia de <i>Fusarium</i>
					Suelo	
San Justo de la Vega	Nistal	102	62	Columbus	Rizoma	Origen de los plantones: de las fincas de afectadas de <i>Fusarium</i> . Plantas sanas visiblemente.
					Suelo	



Tabla 3. Parcelas seleccionadas para el muestreo (continuación).

Municipio	Localidad	Polígono	Parcela	Variedad	Tipo muestra	Observaciones
San Justo de la Vega	Nistal	103	50	Columbus	Rizoma Suelo	Origen de los plantones: de las fincas de afectadas de <i>Fusarium</i> . Plantas sanas visiblemente
Turcia	Gavilanes de Órbigo	106	123	Columbus	Rizoma Suelo	Plantas con poco desarrollo
San Justo de la Vega	San Román de la Vega	115	95	Apolo	Rizoma	Posible asfixia radicular. Plantas de 2 años.
San Justo de la Vega	San Román de la Vega	114	71-72-73	Columbus	Rizoma Suelo	Posibles daños de <i>Fusarium</i> o <i>Verticillium</i> . Muchas faltas en la parcela. Escaso desarrollo.
San Justo de la Vega	San Román de la Vega	115	95	Apolo	Suelo	Muchas faltas en la parcela. Escaso desarrollo.
San Justo de la Vega	Nistal	101	102	Columbus	Rizoma Suelo	Origen de los plantones: de las fincas de afectadas de <i>Fusarium</i> . Plantas sanas visiblemente
San Cristobal de la Polantera	Seisión de la Vega	137	78	Columbus	Rizoma Suelo	Sin sintomatología Suelo de planta próxima a otra de Nugget, sin sintomatología

### 3.1.1. Muestra de suelo

Una vez en el laboratorio, se preparó una solución de hidroxietilcelulosa al 1%, con 990 ml de agua destilada autoclavada y 10 g de hidroxietilcelulosa (Merck, Darmstadt, Alemania).



Figura 40. Muestra de suelo en bandeja y tamiz de 1 mm de diámetro. Foto: Elaboración propia.



Las muestras de suelo se vertieron sobre bandejas metálicas y se dejaron secar a una temperatura ambiente (22-24 °C) hasta que adquirieron una textura suelta durante 7 días. Después se tamizaron con un tamiz de 1 mm de diámetro (Figura 40).

5 g de suelo de cada muestra se vertieron en matraces Erlenmeyer de 250 ml y se añadieron 45 ml de la solución de hidroxietilcelulosa al 1 %. Se agitaron en el agitador magnético durante 1 hora a 300 rpm.



Figura 41. Matraces Erlenmeyer con las muestras de suelo en agitador a 300 rpm. Foto: Elaboración propia.

En la campana de flujo se realizaron diluciones seriadas ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ ) para lo cual fueron necesarios 3 tubos de ensayo por dilución con 9 ml de hidroxietilcelulosa al 1 % cada tubo para cada muestra de suelo. Se repitió 2 veces por cada muestra de suelo (Figura 42).

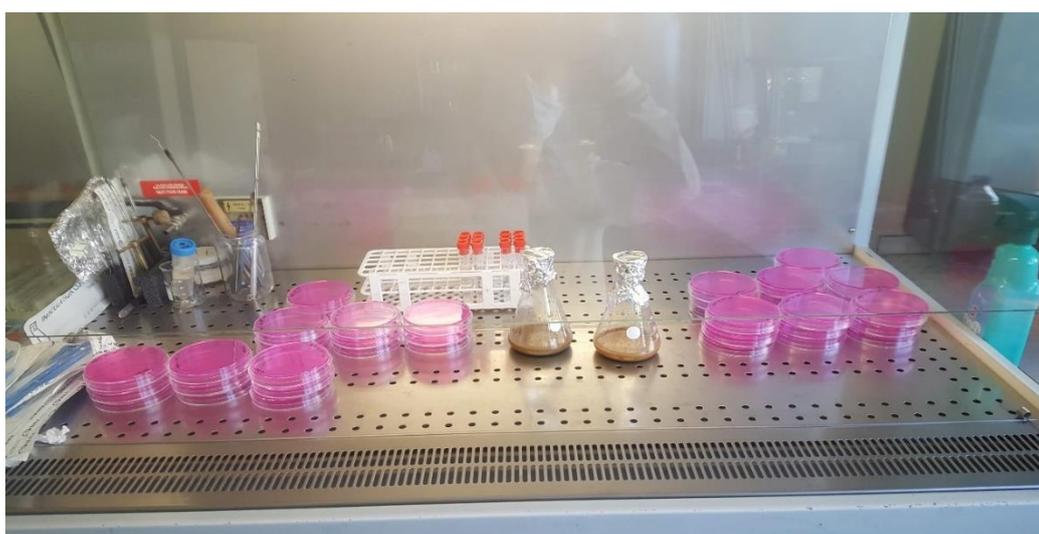


Figura 42. Diluciones seriadas y siembra de las muestras de suelo en la campana de flujo laminar. Foto: Elaboración propia.



Para cada dilución se extrajo con una micropipeta 1 ml del matraz o del tubo y se vertió sobre un tubo de ensayo con 9 ml de hidroxietilcelulosa al 1 % y se mezcló bien hasta tener una mezcla homogénea.

Con una micropipeta se sembró 100  $\mu$ l en una placa Petri con medio de cultivo agar-rosa de Bengala-cloranfenicol (Condalab, Madrid, España). Con la ayuda de un asa de siembra en forma de L se pasó por toda la superficie de la placa repetidas veces para que toda la placa estuviera sembrada. Se realizaron 3 repeticiones por cada dilución, incluidas 3 repeticiones para la dilución de  $10^{-1}$  (mezcla del matraz Erlenmeyer inicial) (Figura 43).

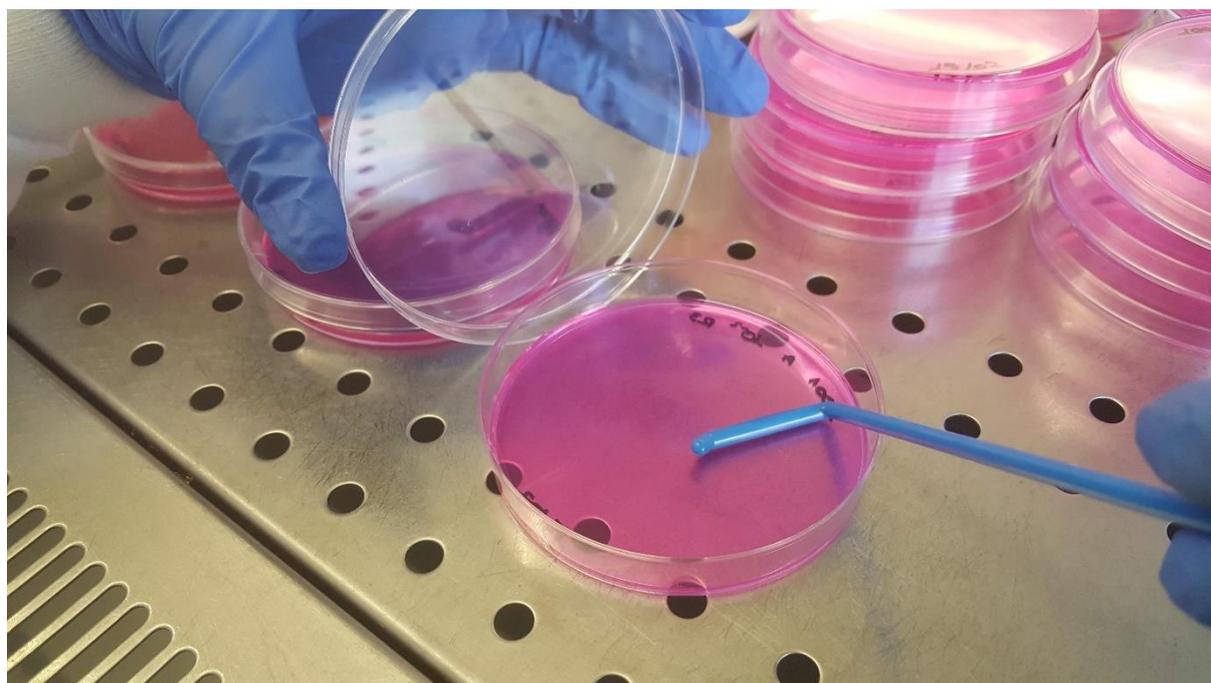


Figura 43. Siembra de las diluciones de la muestra de suelo en placas Petri con medio agar rosa de Bengala-cloranfenicol con ayuda de un asa de siembra en forma de L. Foto: Elaboración propia.

Se incubaron en estufa de cultivo (Selecta) a 25 °C durante 7-15 días (Figura 44).

### 3.1.2. Muestras de rizoma

Para el procesado de material vegetal se realizó dos procedimientos para el aislamiento de hongos: siembra en medio de cultivo y crecimiento en cámara húmeda.

En el primero, se lavó la muestra con agua del grifo, y después se desinfectó con una solución de hipoclorito sódico al 10 % durante 3 minutos y se lavó con agua destilada durante 6 minutos. A continuación, se dejó secar en cámara de flujo laminar durante 1 hora. De cada muestra se realizaron 3 repeticiones y de cada una se sembraron 6 trozos pequeños. Se realizaron en placas Petri con medio



agar-rosa de Bengala-cloranfenicol y medio patata-dextrosa-agar (PDA, Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Se mantuvieron a 25 °C durante 7-15 días.

En el caso del aislamiento de hongos mediante una cámara húmeda, se colocó el rizoma directamente en una placa Petri con un papel estéril humedecido y se selló con parafilm® para asegurar una humedad interior superior al 90%. Se mantuvo durante 3-4 días en condiciones de oscuridad a 22-23 °C. Posteriormente se identificaron morfológica y visualmente con ayuda del microscopio y se sembraron en placas Petri con medio agar-rosa de Bengala-cloranfenicol. Se mantuvieron a 25° durante 7-15 días (Figura 44).

### 3.2. Identificación de los aislados

Se repicaron los hongos encontrados en medio PDA (Figura 44). Se realizó una primera identificación visual mediante microscopio óptico. Se conservaron mediante una solución de glicerol al 50 % las esporas de cada aislamiento a -20 °C y -80 °C.

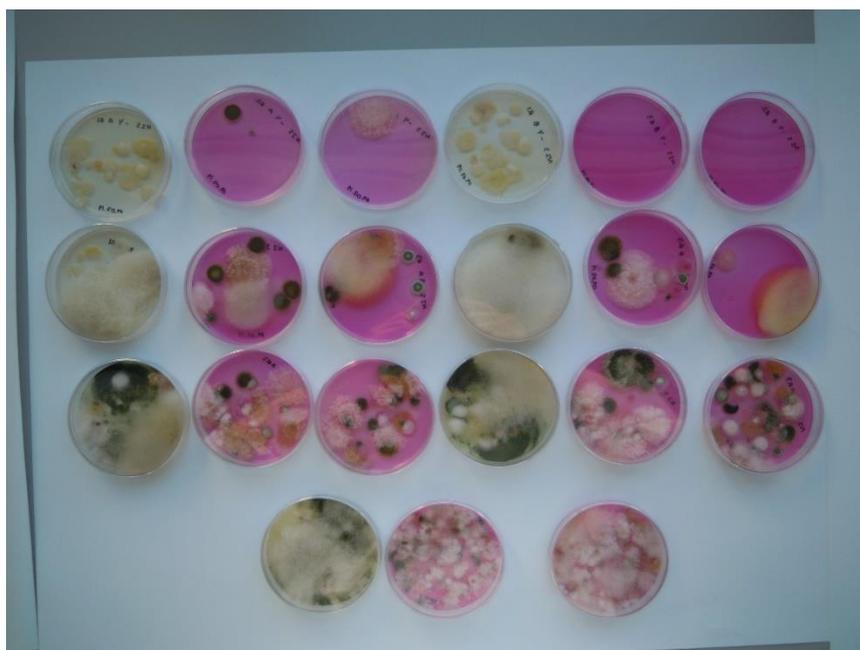


Figura 44. Aislados obtenidos en placas Petri con medio agar rosa de Bengala-cloranfenicol a partir de las muestras de suelo y rizoma. Foto: Sara Mayo Prieto

Para una identificación genética se enviaron los aislados al Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de León. Se aisló el ADN de cada aislamiento y seguidamente se procedió a amplificar la región de interés (fragmento *ITS*). Posteriormente se purificó el amplicón y finalmente se realizó su secuenciación.



Para la identificación de los hongos, las secuencias de los fragmentos se introdujeron en la base de datos del GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) con el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

### 3.3. Conservación de los aislados

Una vez identificados los aislados tanto los agentes de biocontrol como los patógenos, se almacenaron en la colección de “Patógenos y Antagonistas del Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales” de la Escuela de Ingeniería Agraria y Forestal (EIAF) de la Universidad de León.

Para el almacenamiento de los aislados de *Fusarium* se empleó papel de filtro autoclavado. En la campana de flujo laminar, se recogió con ayuda de una aguja mangada un poco de micelio y se sembró en una placa de Petri con medio PDA. Posteriormente se colocaron varios papeles de filtro autoclavados (121 °C 20 min) distribuidos por toda la placa Petri y se incubaron a 25 °C durante 7 días. Posteriormente, en la campana de flujo se recogieron esos papeles con micelio del hongo con ayuda de unas pinzas previamente desinfectadas guardándolos en sobres de papel autoclavados (121 °C 20 min). Estos sobres se depositaron en una bandeja con gel de sílice para eliminar la humedad durante 7 días. Por último, se almacenaron a -20 °C.

Para el almacenamiento de *Trichoderma* se realizó una mezcla de glicerol al 50 % y las esporas de *Trichoderma* en microtubos Eppendorf® de 1,5 ml. En primer lugar, en la campana de flujo con la micropipeta se añaden 5-10 ml de agua destilada autoclavada (121 °C 20 min) en la placa Petri con el aislado de *Trichoderma*, y con ayuda de la misma punta se raspó toda la superficie para resuspender las esporas en el agua. 1 ml de solución de esporas obtenida tras su paso a través de un filtro, se vertió con la ayuda de una micropipeta en un microtubo Eppendorf® de 1.5 ml, se centrifugó durante 10 minutos a 13.200 rpm. Se retiró una parte del sobrenadante y se sustituyó por una solución de glicerol al 85 %, de tal forma que quedara una solución final de glicerol al 50 %. Se mezcló bien para disolver el pellet de esporas hasta obtener una solución homogénea y se almacenó a -20°C.

### 3.4. Ensayos antifúngicos *in vitro*

#### *3.4.1. Preparación de aislados de estudio*

Se realizó una siembra de los aislados seleccionados en placas Petri con medio PDA 15 días antes del comienzo de los ensayos.



Para sembrar los aislados de *Trichoderma*, se mezcló el contenido del microtubo con ayuda de una micropipeta hasta conseguir que el pellet de esporas se disolviera completamente. Se extrajo 30  $\mu$ l de solución de esporas y se vertió en el centro de placas de Petri de 60 mm de diámetro con medio PDA. Con un asa de siembra se extendió la solución por toda la superficie. En el caso de los aislados de *Fusarium*, se cogió un pequeño pedazo de un papel de filtro donde se habían almacenado con la ayuda de una pinza esterilizada y se depositó en el centro de la placa. Por último, se almacenaron las placas en una estufa de cultivo en condiciones de oscuridad y a una temperatura de 25°C hasta que el hongo ocupara toda la superficie de la placa Petri.

#### 3.4.2. Ensayo mediante el uso de membranas

Se realizó un ensayo antifúngico en membranas cuyo objetivo fue evaluar la capacidad de los diferentes aislados de *Trichoderma* para producir metabolitos que inhiban el crecimiento del patógeno.

Para este ensayo se cubrió la superficie de las placas Petri de 9 cm de diámetro, con medio de cultivo PDA, con una membrana de celofán autoclavada (121 °C 20 min). Sobre ésta y en el centro de la placa se colocaron discos de micelio de 6 mm de diámetro de *Trichoderma* spp. (Figura 45). Se incubaron durante 48 horas a 25 °C. Después, se retiraron las membranas de celofán junto con el micelio de *Trichoderma* que había crecido sobre ellas y se colocaron, en el mismo lugar donde se colocó el disco de micelio de *Trichoderma*, los discos de micelio de *Fusarium* spp.



Figura 45. Placa Petri con medio Patata-Dextrosa-Agar (PDA) con *Trichoderma* spp. sobre membrana de celofán. Foto: Sara Mayo Prieto.

El crecimiento de *Fusarium* se midió a los 5 días y a los 8 días tras su siembra, realizando una medición del diámetro del micelio horizontal y verticalmente (Figura 46). Se realizaron 4 repeticiones.

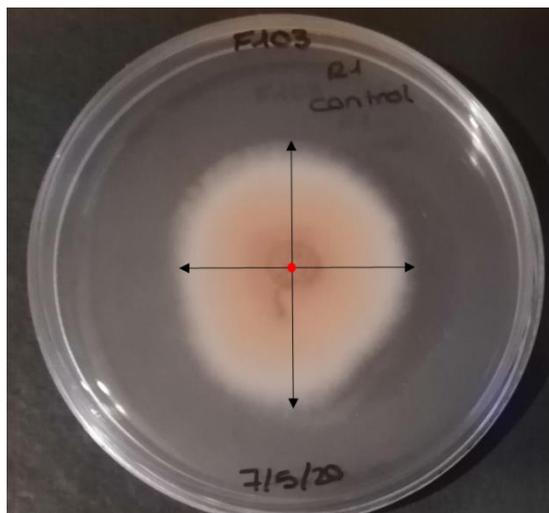


Figura 46. Medición del diámetro de la colonia de *F. oxysporum* en el control del cultivo de membranas. Foto: Elaboración propia.

Para el control de desarrollo de los aislados de *Fusarium* se siguió el mismo procedimiento salvo que no se colocó ningún aislado de *Trichoderma* previamente en el medio de cultivo.

El porcentaje de inhibición mediante el uso de membranas (IM) se calculó con la siguiente fórmula:

$$IM (\%) = \frac{C - T}{T} \times 100$$

Donde, IM es el porcentaje de inhibición mediante el uso de membranas, C es el diámetro del control de *Fusarium* y T es el diámetro del *Fusarium* después de haber estado expuesto a metabolitos de *Trichoderma*.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias (diferencia mínima significativa o DMS) con un nivel de significación  $p < 0,05$  con el programa informático IBM SPSS (IBM Statistics for Windows, Versión 26.0. Armonk, NY:IBM Corp).

### 3.4.3. Ensayo mediante confrontación directa

En este ensayo se evaluó la capacidad de biocontrol de *Trichoderma* spp., lo cual ocurre cuando éste es capaz de crecer sobre el patógeno llegando incluso a destruirlo.

Se colocaron dos discos de micelio de 6 mm de diámetro, uno de un aislado de *Trichoderma* y otro de *Fusarium*, separados 5,5 cm de distancia en la misma placa Petri de 9 cm de diámetro con medio PDA y se incubaron durante 5 días a 25 °C (Figura 47).

Para cada aislado de *Trichoderma* se realizaron 4 repeticiones.

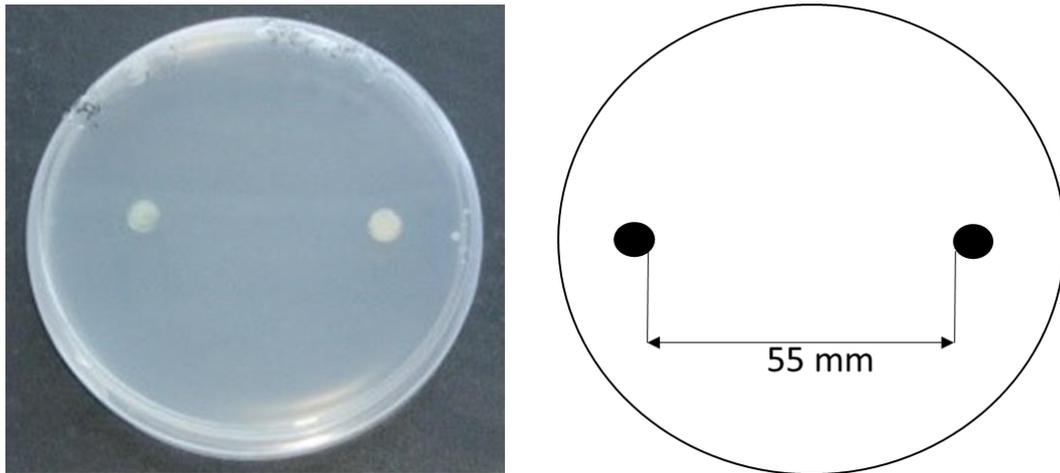


Figura 47. (a) Siembra de cultivo dual en placa Petri con medio de cultivo Patata-Dextrosa-Agar (PDA); (b) Plantilla para siembra de cultivo dual. Foto: Elaboración propia.

Transcurridos 5 días desde la siembra, se midió la distancia entre el punto de siembra del patógeno y el punto más alejado de la colonia ( $r_1$ ) y la distancia entre el punto de siembra del patógeno y el borde de la colonia, donde *Trichoderma* y el patógeno entraron en contacto ( $r_2$ ) (Figura 48).

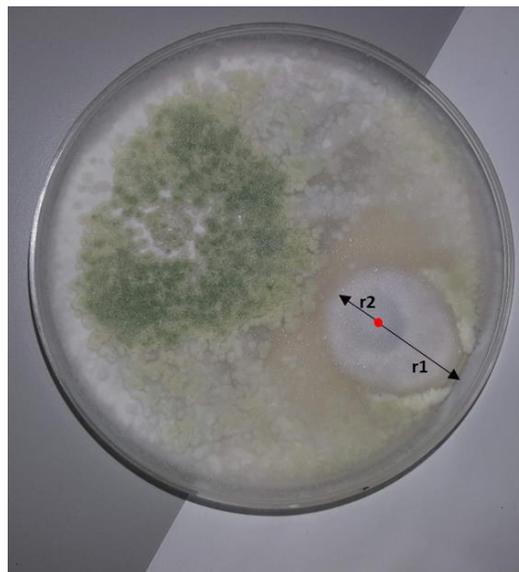


Figura 48. Medición de las distancias  $r_1$  y  $r_2$  en cultivo dual de *F. oxysporum* (F103) y *T. hamatum* (T324). Foto: Elaboración propia.

Para calcular el porcentaje de inhibición mediante cultivo dual (ID) se utilizó la siguiente fórmula:

$$ID (\%) = \frac{r_1 - r_2}{r_2} \times 100$$



Donde, ID es el porcentaje de inhibición mediante confrontación directa,  $r_1$  es la distancia entre el punto de siembra del patógeno y el punto más alejado de la colonia;  $r_2$  es la distancia entre el punto de siembra del patógeno y el borde de la colonia.

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias (DMS) con un nivel de significación  $p < 0,05$  con el programa informático IBM SPSS (IBM Statistics for Windows, Versión 26.0. Armonk, NY: IBM Corp).



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Aislados obtenidos en las parcelas de estudio

Se obtuvieron 11 aislados de *Trichoderma* spp. y 24 aislados de *Fusarium* spp., obtenidos tanto de suelo como de rizoma en diferentes parcelas de cultivo de lúpulo en la provincia de León. Sin embargo, tras una revisión bibliográfica, se seleccionaron sólo 3 especies de *Fusarium* que causaban daños en lúpulo (Tabla 4).

Tabla 4. Aislados de *Trichoderma* y de *Fusarium* utilizados en los ensayos *in vitro*-

LOCALIDAD	TIPO MUESTRA	ESPECIE	ID
San Román de la Vega	Suelo	<i>Fusarium culmorum</i>	F076
San Román de la Vega	Rizoma	<i>Fusarium sambucinum</i>	F079
San Román de la Vega	Suelo	<i>Fusarium oxysporum</i>	F100
Gavilanes de Órbigo	Suelo	<i>Trichoderma hamatum</i>	T311
Gavilanes de Órbigo	Suelo	<i>Trichoderma virens</i>	T312
Nistal	Suelo	<i>Trichoderma spirale</i>	T314
Gavilanes de Órbigo	Rizoma	<i>Trichoderma rossicum</i>	T316
Nistal	Rizoma	<i>Trichoderma virens</i>	T317
Nistal	Rizoma	<i>Trichoderma spirale</i>	T319
San Román de la Vega	Suelo	<i>Trichoderma brevicompactum</i>	T323
San Román de la Vega	Rizoma	<i>Trichoderma hamatum</i>	T324
Seisión de la Vega	Suelo	<i>Trichoderma gamsii</i>	T327
Gavilanes de Órbigo	Suelo	<i>Trichoderma rossicum</i>	T328
San Román de la Vega	Suelo	<i>Trichoderma harzianum</i>	T329

Con los aislados seleccionados, se han realizado los ensayos *in vitro* para comprobar su capacidad de inhibición de *F. oxysporum*, *F. culmorum* y *F. sambucinum*.

### 4.2. Ensayos *in vitro*.

Se realizó una comparación de los aislados de *Trichoderma* para comprobar si la procedencia podía afectar al porcentaje de inhibición frente a *Fusarium* spp. Cuando se analizó la fuente de extracción de los aislamientos, no tuvo diferencias significativas entre los aislados de *Trichoderma* obtenidos en suelo y los de rizoma. Por lo tanto, los distintos aislamientos se comportaron de igual manera en condiciones *in vitro* independientemente si se aislaron del rizoma o del suelo.



A continuación, se presentan los resultados obtenidos en ambos ensayos para los diferentes aislados de *Fusarium*.

#### 4.2.1. *Fusarium oxysporum*

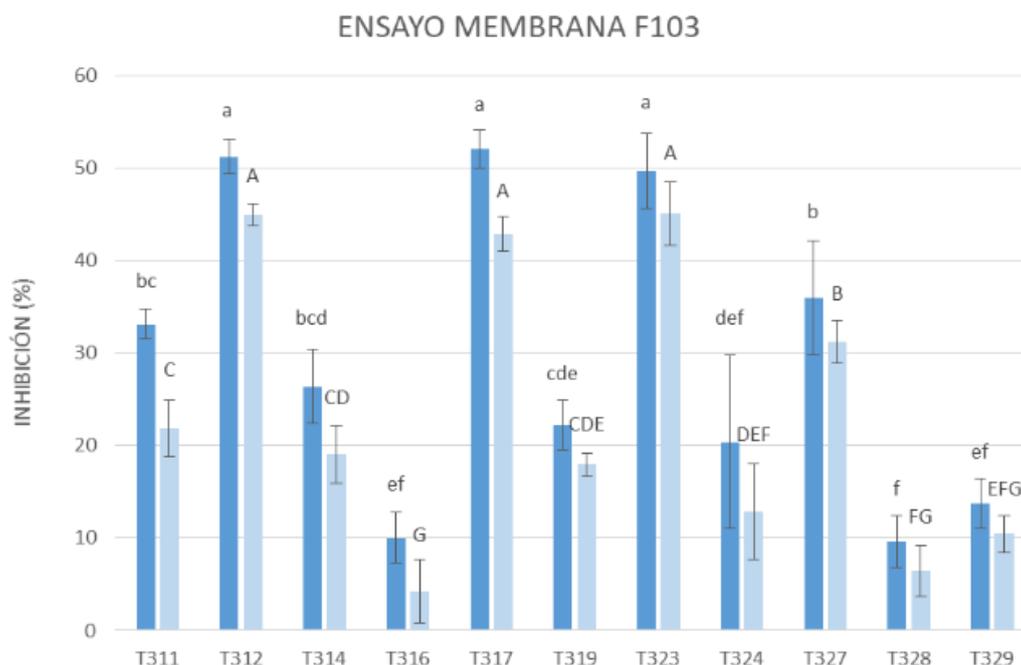


Figura 49. Porcentaje de inhibición de los aislados de *Trichoderma* frente a *F. oxysporum* (F103) en el ensayo mediante el uso de membranas. Color azul oscuro: porcentajes en el día 5 del ensayo. Color azul claro: porcentajes en el día 8 del ensayo. Los valores con letras diferentes presentan diferencias significativas (test DMS,  $p < 0,05$ ). Las letras minúsculas corresponden al análisis estadístico del ensayo mediante el uso de membranas del día 5 y las mayúsculas al del día 8.

En el ensayo para la determinación de la capacidad de inhibición del desarrollo de *F. oxysporum* mediante la producción de metabolitos secundarios (Figura 49), los aislados *T. virens* (T312 y T317) y *T. brevicompactum* (T323) fueron los que mayor porcentaje de inhibición presentaron tanto en el día 5 como en el día 8. En el día 5, el porcentaje de inhibición rondaron el 50 %, siendo T317 el mayor con un 52,05 %. Sin embargo, en el día 8 fue T323 el aislado con mejor porcentaje de inhibición ha obtenido con un 45,03 %.

*T. rossicum* (T316 y T328) y *T. harzianum* (T329) fueron los aislados con porcentajes más bajos de inhibición tanto en el día 5 como en el día 8, siendo este menor a un 15% (Figura 50).

El resto de aislados, *T. hamatum* (T311 y T324) y *T. spirale* (T314 y T319) presentaron porcentajes de inhibición entre un 35 % y un 20 %

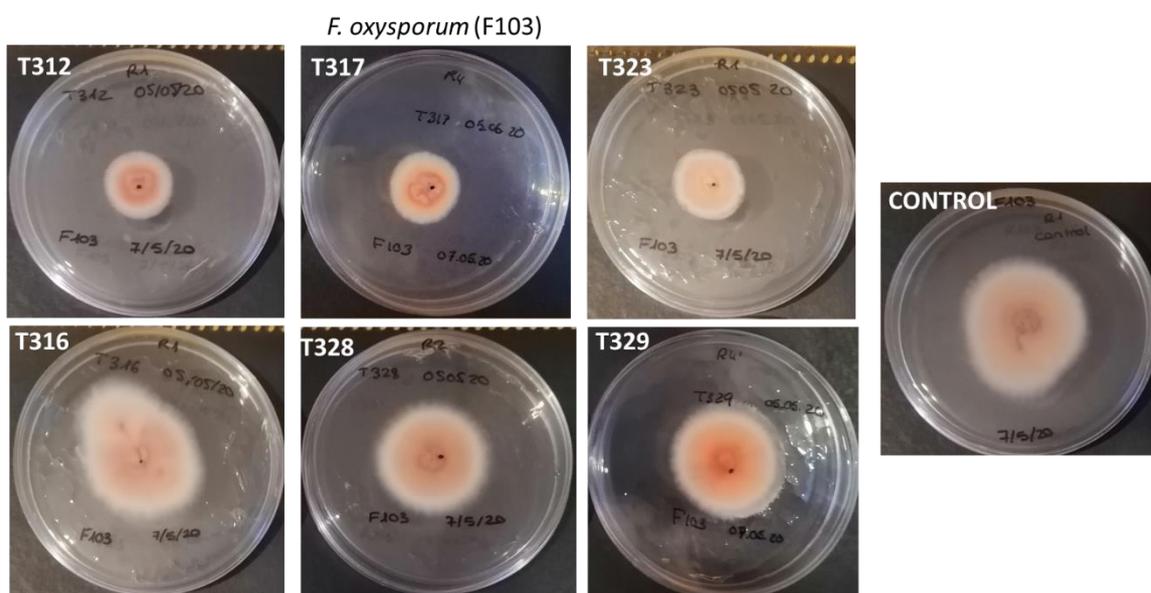


Figura 50. Crecimiento de *F. oxysporum* (F103) en ensayo de membranas. (a) F103 con *T. virens* (T312); (b) F103 con *T. virens* (T317); (c) F103 con *T. brevicompactum* (T323); (d) F103 con *T. rossicum* (T316); (e) F103 con *T. rossicum* (T328); (f) F103 con *T. harzianum* (T329); (f) control de F103. Fotos: Elaboración propia.

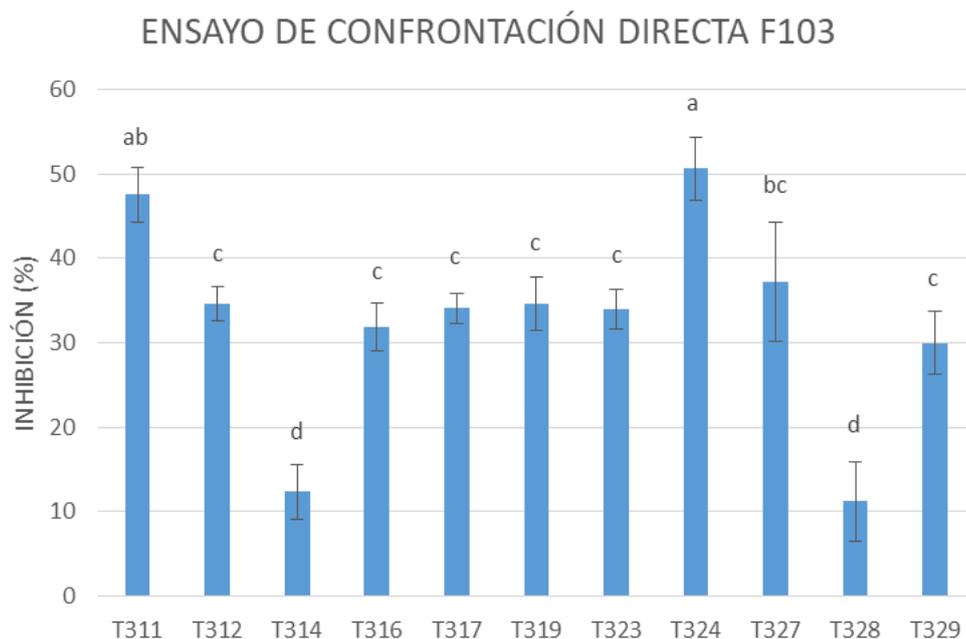


Figura 51. Porcentaje de inhibición de los aislados de *Trichoderma* frente a *F. oxysporum* (F103) en el ensayo mediante confrontación directa. Color azul: porcentaje en el día 5 del ensayo. Los valores con letras diferentes presentan diferencias significativas (test DMS,  $p < 0,05$ )

En el ensayo de cultivo dual o de confrontación directa (Figura 51) *T. hamatum* (T324) fue el que mayor porcentaje de inhibición presentó (50, 59 %) y *T. rossicum* (T328) y *T. spirale* (T314) los que menor porcentaje con un 11,21 % y un 12,38 % respectivamente. El resto de aislados han obtuvieron porcentajes de inhibición entre un 47,50 % y un 29,98 % (Figura 52).

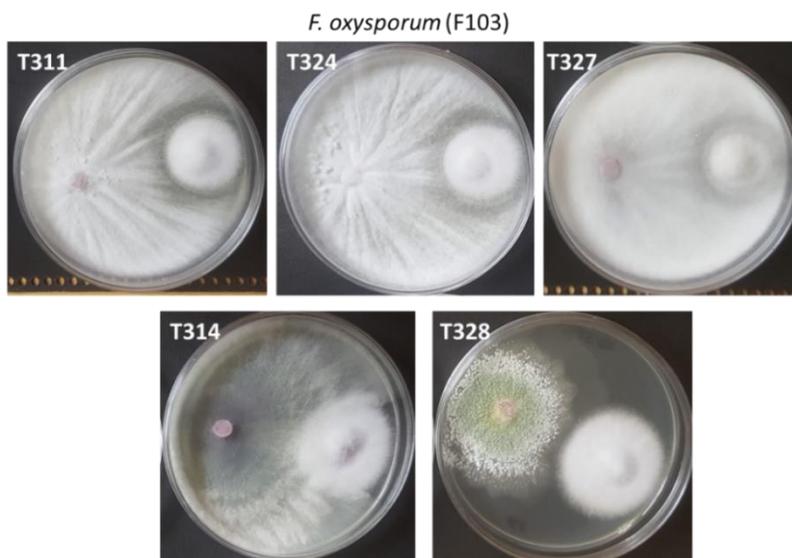


Figura 52. Crecimiento de *F. oxysporum* (F103) (derecha) frente a *Trichoderma* (izquierda) ensayo dual. (a) F103 con *T. hamatum* (T311); (b) F103 con *T. hamatum* (T324); (c) F103 con *T. gamsii* (T327); (d) F103 con *T. spirale* (T314); (e) F103 con *T. rossicum* (T328). Fotos: Elaboración propia.

#### 4.2.2. *Fusarium sambucinum*

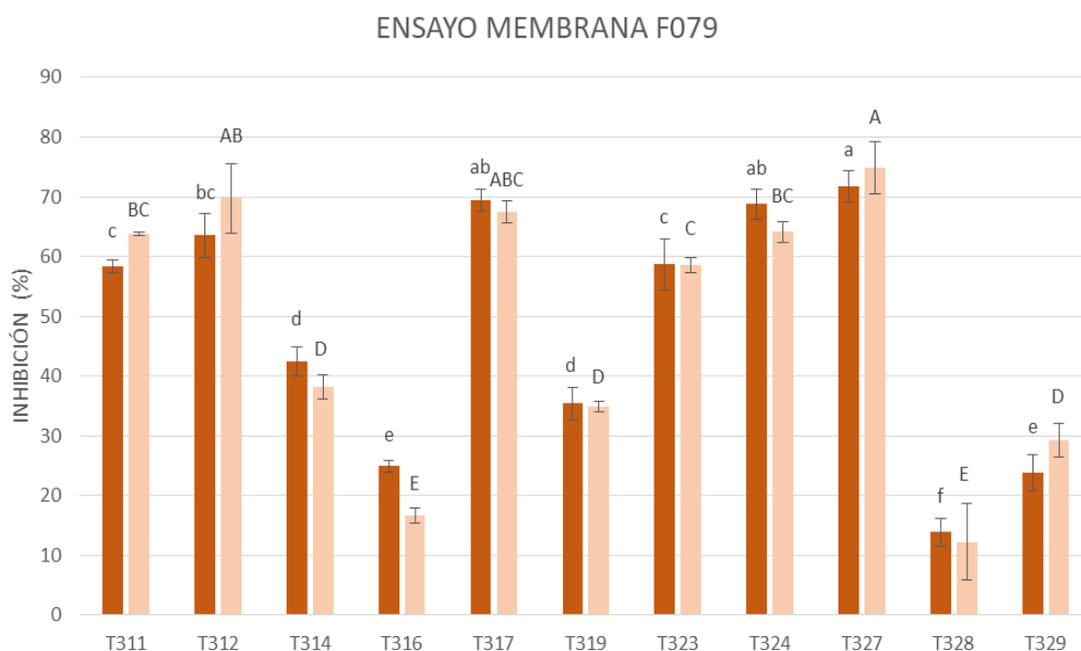


Figura 53. Porcentaje de inhibición de los aislados de *Trichoderma* frente a *F. sambucinum* (F079) en el ensayo mediante el uso de membranas. Color naranja oscuro: porcentajes en el día 5 del ensayo. Color naranja claro: porcentajes en el día 8 del ensayo. Los valores con letras diferentes presentan diferencias significativas (test DMS,  $p < 0,05$ ). Las letras minúsculas corresponden al análisis estadístico del ensayo mediante el uso de membranas del día 5 y las mayúsculas al del día 8.



### *F. sambucinum* (F079)

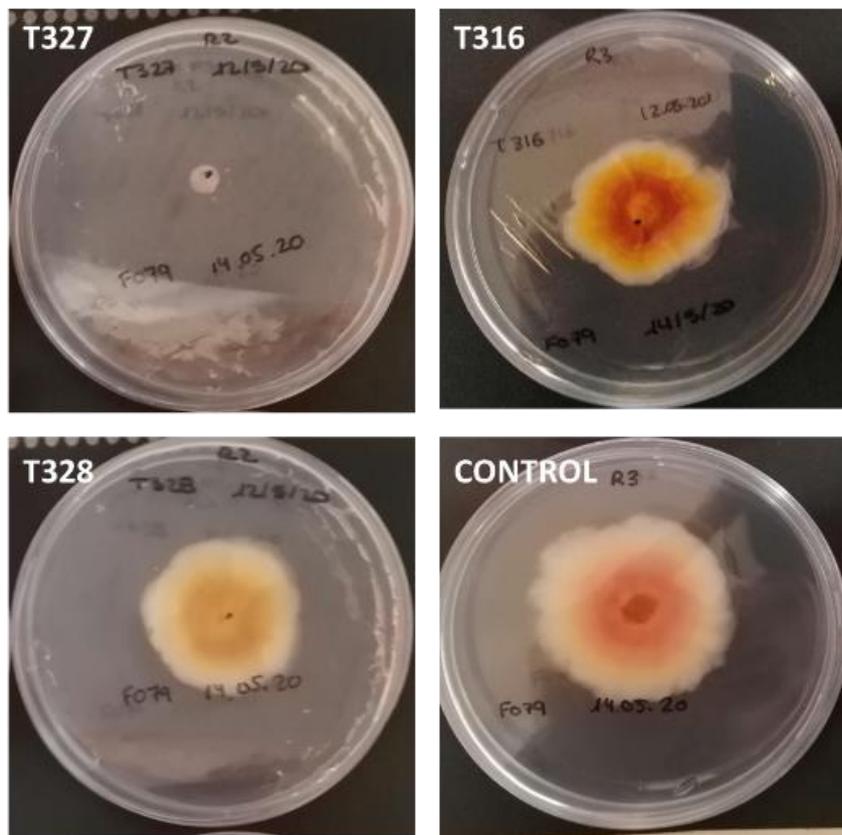


Figura 54. Crecimiento de *F. sambucinum* (F079) en ensayo de membranas. (a) F079 con *T. gamsii* (T327); (b) F079 con *T. rossicum* (T316); (c) F079 con *T. rossicum* (T328); (d) control de F079. Foto: Elaboración propia.

En el ensayo para la determinación de la capacidad de inhibición del desarrollo de *F. sambucinum* mediante la producción de metabolitos secundarios (Figura 53), fue el aislado *T. gamsii* (T327) con el mejor porcentaje de inhibición tanto en el día 5 como en el día 8, siendo superior a 70 %. T327 presentó un valor en el día 5 de 71,81 % y de 74,90 % en el día 8.

*T. hamatum* (T311 y T324), *T. virens* (T312 y T317) y *T. brevicompactum* (T323) mostraron una inhibición entre 50 % y 70 % en los días 5 y 8 del ensayo. *T. spirale* (T314 y T319), *T. rossicum* (T316) y *T. harzianum* (T329) obtuvieron porcentajes de inhibición entre el 50 % y el 15 %.

Por el contrario, fue *T. rossicum* (T328) el que obtuvo el peor porcentaje en ambos días con valores de 13,84 % el día 5 y 12,25 % el día 8. También en el día 8, *T. rossicum* (T316) presentó un porcentaje de inhibición muy bajo sin diferencias significativas entre ellos (Figura 54).



## ENSAYO DE CONFRONTACIÓN DIRECTA F079

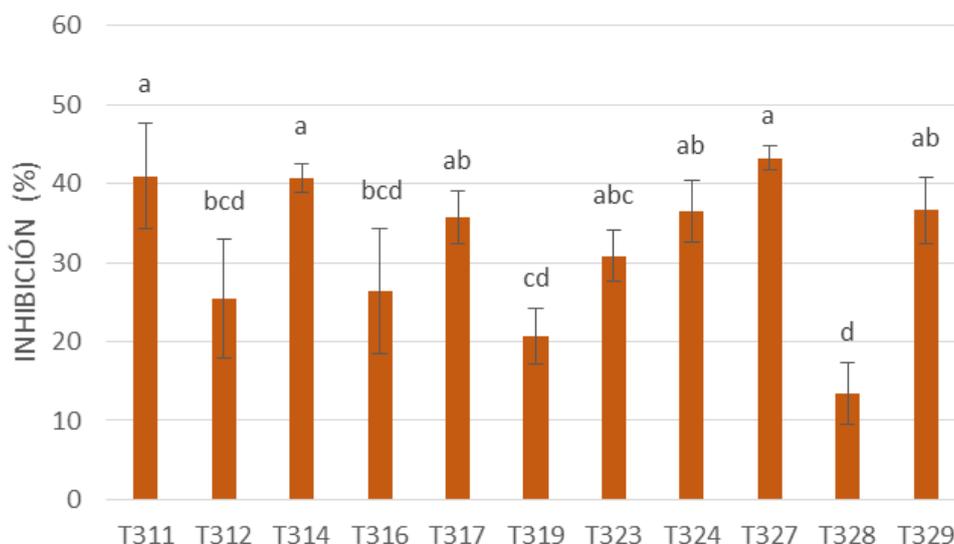


Figura 55. Porcentaje de inhibición de los aislados de *Trichoderma* frente a *F. sambucinum* (F079) en el ensayo mediante confrontación directa. Color naranja: porcentaje en el día 5 del ensayo. Los valores con letras diferentes presentan diferencias significativas (test DMS,  $p < 0,05$ )

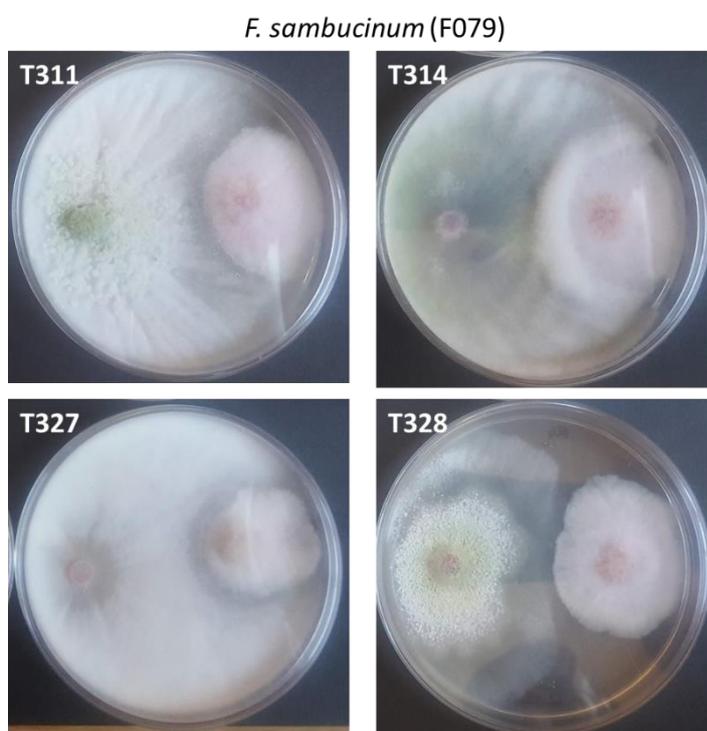


Figura 56. Crecimiento de *F. sambucinum* (F079) (derecha) frente a *Trichoderma* (izquierda) en ensayo dual. (a) F079 con *T. hamatum* (T311); (b) F079 con *T. virens* (T314); (c) F079 con *T. gamsii* (T327); (d) F079 con *T. rossicum* (T328). Fotos: Elaboración propia.

En el cultivo dual o de confrontación directa (Figura 55) *T. hamatum* (T311), *T. spirale* (T314) y *T. gamsii* (T327) fueron los que mejores porcentajes de inhibición presentaron, siendo 40,96 %, 40,74 % y 43,20 % respectivamente (Figura 56). *T. virens* (T317), *T. brevicompactum* (T323), *T. hamatum* (T324), *T. harzianum* (T329) presentaron porcentajes de inhibición entre 30 % y 40 %.

*T. rossicum* (T328) obtuvo un porcentaje de 13,38 % representando el porcentaje más bajo de todos los aislados.

El porcentaje de inhibición del resto de aislados fue entre 15 % y 30 %.



#### 4.2.3. *Fusarium culmorum*

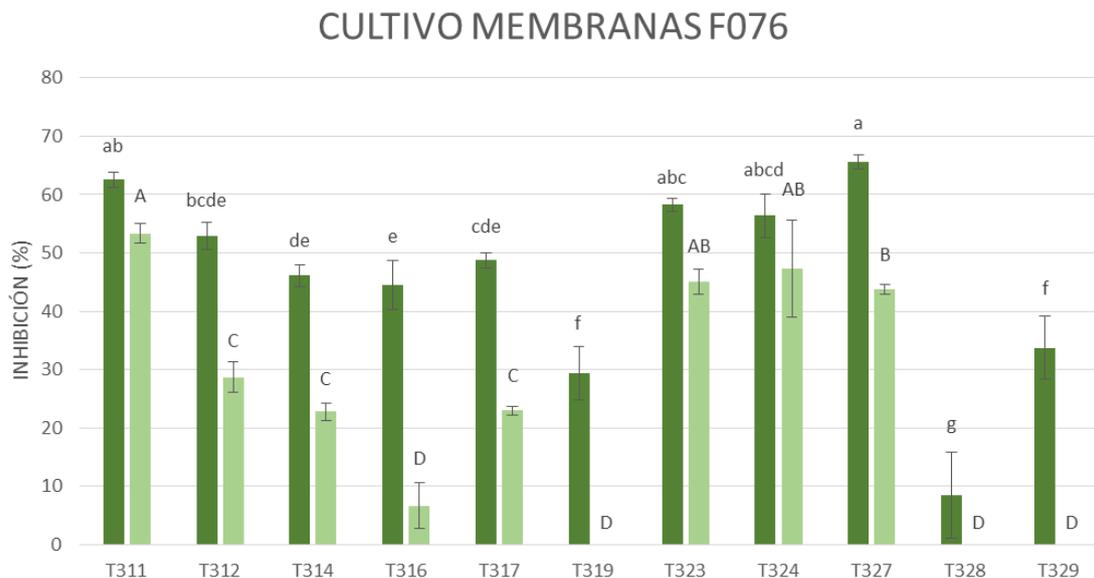


Figura 57. . Porcentaje de inhibición de los aislados de *Trichoderma* frente a *F. culmorum* (F076) en el ensayo mediante el uso de membranas. Color verde oscuro: porcentajes en el día 5 del ensayo. Color verde claro: porcentajes en el día 8 del ensayo. Los valores con letras diferentes presentan diferencias significativas (test DMS,  $p < 0,05$ ). Las letras minúsculas corresponden al análisis estadístico del ensayo mediante el uso de membranas del día 5 y las mayúsculas al del día 8.

En el ensayo de cultivo de membranas (Figura 57), el día 5 fue *T. gamsii* (T327) el que mayor porcentaje de inhibición presentó con un 65,50 %, y el día 8 de cultivo *T. hamatum* (T311) con un valor de 53,33 %.

En el día 5 de cultivo *T. hamatum* (T311 y T324), *T. brevicompactum* (T323) y *T. virens* (T312) obtuvieron porcentajes entre el 65 % y el 50 %. Por otro lado, los aislados *T. spirale* (T314 y T319), *T. virens* (T317), *T. rossicum* (T316) y *T. harzianum* (T329) presentaron una inhibición de entre el 50 % y el 10 %.

En el día 8 *T. gamsii* (T327), *T. hamatum* (T324) y *T. brevicompactum* (T323) tuvieron porcentajes entre el 50 % y el 40 %. Mientras que porcentajes entre el 40 % y el 10 % fueron obtenidos por *T. virens* (T312 y T317) y *T. spirale* (T314).

*T. rossicum* (T328) fue el aislado que peor porcentaje de inhibición ha presentó en el día 5 de cultivo siendo este de 8,43 %. En el día 8 de cultivo, *T. rossicum* (T316 y T328), *T. spirale* (T319) y *T. hamatum* (T329) obtuvieron los porcentajes más bajos, siendo el de T316 de un 6,67% y el resto de 0% (Figura 58).



### F. culmorum (F076)

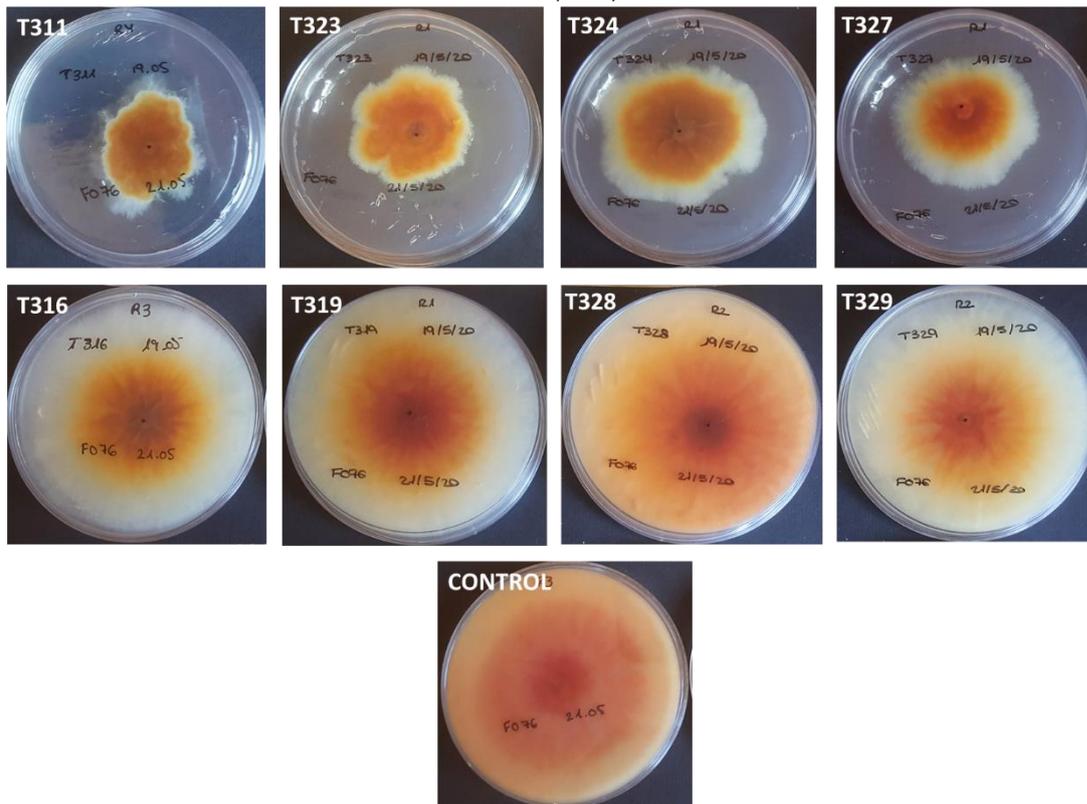


Figura 58. Crecimiento de *F. culmorum* (F076) en ensayo de membranas. (a) F076 con *T. hamatum* (T311); (b) F076 con *T. brevicompactum* (T323); (c) F076 con *T. hamatum* (T324); (d) F076 con *T. gamsii* (T327); (e) F076 con *T. rossicum* (T316) (f) F076 con *T. spirale* (T319); (g) F076 con *T. rossicum* (T328); (h) F076 con *T. harzianum* (T329); (i) control de F076. Fotos: Elaboración propia.

## ENSAYO DE CONFRONTACIÓN DIRECTA F076

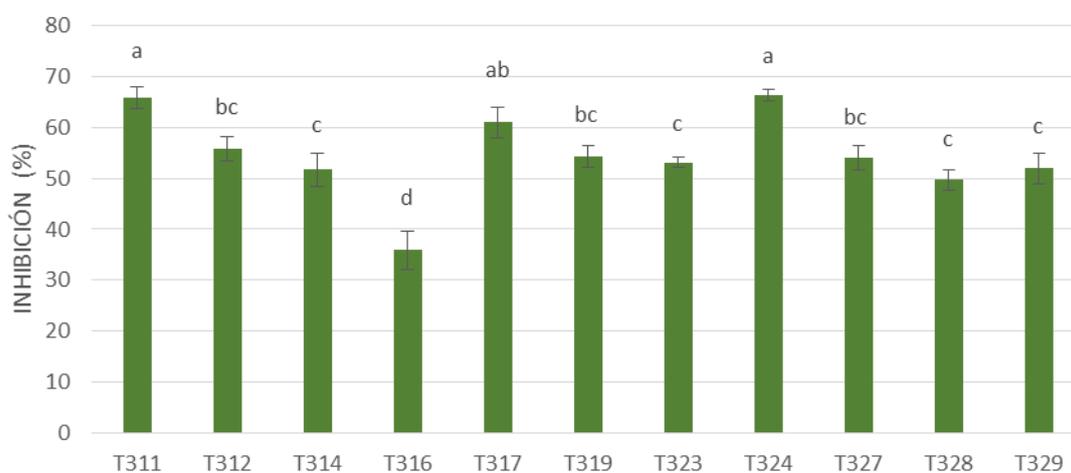


Figura 59. Porcentaje de inhibición de los aislados de *Trichoderma* frente a *F. culmorum* (F076) en el ensayo mediante confrontación directa. Color verde: porcentaje en el día 5 del ensayo. Los valores con letras diferentes presentan diferencias significativas (test DMS,  $p < 0,05$ ).



En el cultivo dual o mediante confrontación directa con *F. culmorum* (Figura 59) el mayor porcentaje de inhibición fue alcanzado por *T. hamatum* (T311 y T324) con valores superiores al 65 %. Sin embargo *T. rossicum* (T316) obtuvo el porcentaje más bajo de inhibición. Mientras que el resto de aislados mostraron una inhibición de entre el 65 % y el 50 % (Figura 60).

*F. culmorum* (F076)

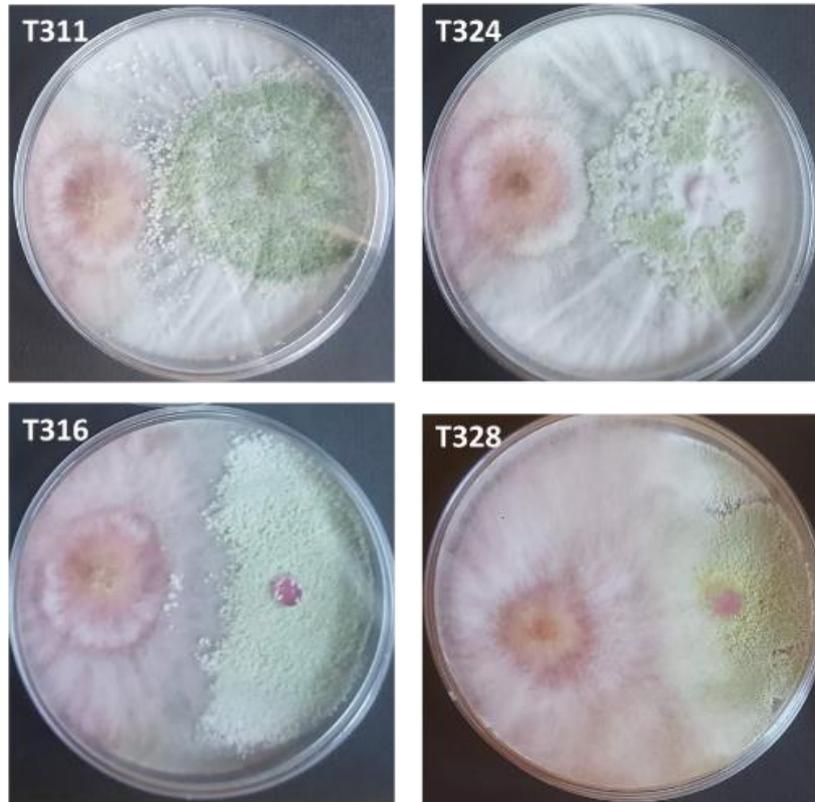


Figura 60. Crecimiento de *F. culmorum* (F076) (izquierda) frente a *Trichoderma* (derecha) en ensayo dual. (a) F076 con *T. hamatum* (T311); (b) F076 con *T. hamatum* (T324); (c) F076 con *T. rossicum* (T316); (d) F076 con *T. rossicum* (T328).  
Fotos: Elaboración propia.



## 5. DISCUSIÓN

Todos los ensayos realizados *in vitro* en el desarrollo de este trabajo se llevaron a cabo con aislamientos obtenidos de muestras vegetales de lúpulo y de muestras de suelo tomadas de parcelas donde el cultivo de esta planta estaba instaurado. En total se trabajó con 3 aislamientos de *Fusarium*, y con 11 aislamientos de *Trichoderma*. Los ensayos *in vitro* se realizaron para comprobar la capacidad de inhibición de los agentes de biocontrol en el crecimiento de *Fusarium* spp. que causan graves pérdidas en el lúpulo. Los ensayos *in vitro* resultan muy útiles para la identificación de nuevos aislados con potencial de biocontrol, que luego deben ser evaluadas mediante ensayos *in vivo* (Anees *et al.*, 2010; Díaz *et al.*, 2013; Álvarez-García *et al.*, 2020). Para ello se llevaron a cabo dos ensayos, por confrontación directa o cultivo dual y mediante el uso de membranas.

El cultivo dual tiene como finalidad determinar el potencial antagónico de cada aislado de *Trichoderma* spp., donde los mecanismos más importantes que se dan son la competencia tanto por espacio como por nutrientes, la producción de metabolitos antifúngicos y el micoparasitismo (Błaszczuk *et al.*, 2017; Tamandegani *et al.*, 2020). El crecimiento y desarrollo de *Trichoderma* se ve favorecido en condiciones de competencia frente a otros hongos como *Fusarium* spp. debido a su rápido crecimiento (Maciel *et al.*, 2014).

En la confrontación directa, todos los aislamientos de *Trichoderma* empleados fueron capaces de inhibir el crecimiento de *F. oxysporum* afectando al desarrollo del patógeno. Este resultado ya fue obtenido en numerosos estudios en los que se demostró la capacidad inhibidora de *Trichoderma* ante este fitopatógeno evaluado en numerosos cultivos tales como el garbanzo, la alubia, el hibisco (Dubey y Suresh, 2006; Fakhrunnisa *et al.*, 2006; Maciel *et al.*, 2014; Sánchez-García *et al.*, 2017; Zehra *et al.*, 2017; Michel-Aceves *et al.*, 2019; Tamandegani *et al.*, 2020). El grado de inhibición varió de unas especies del antagonista a otras, e incluso se encontraron diferencias significativas en aislados de la misma especie, como ocurrió con *T spirale* (T314 y T319) y *T. rossicum* (T316 y T328), esto se podría atribuir a la selectividad de *Trichoderma* en la producción de enzimas y sustancias antibióticas y antifúngicas (De Souza Ramos *et al.*, 2008; González *et al.*, 2011; Hermosa *et al.*, 2012). El aislado que obtuvo el porcentaje de inhibición de *F. oxysporum* más bajo fue *T. rossicum* (T328) creciendo prácticamente en igual proporción que el patógeno como en el estudio realizado por Tamandegani *et al.* (2020) en el que el antagonista tuvo menor efecto inhibidor en patógenos transmitidos por el suelo como *F. oxysporum*. *T. hamatum* (T311 y T324) y *T. gamsii* (T327) presentaron un gran efecto inhibidor sobre el patógeno reduciendo considerablemente el diámetro de la colonia destacando sobre el resto de aislados. Este resultado coincide con los resultados obtenidos en otro estudio en el que *T. hamatum* mostró inhibición en el crecimiento de *F. oxysporum* con un porcentaje incluso más elevado



que en el presente estudio siendo este de un 79,97 % (Fakhrunnisa *et al.*, 2006) La producción de enzimas y metabolitos de *Trichoderma* en el cultivo dual podría ser la responsable de la formación de una zona de inhibición en el contacto entre este y el patógeno (Zehra *et al.*, 2017). Se ha encontrado en diversos estudios que *T. harzianum* fue la especie que presentó mejores aptitudes para la inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* (Dubey y Suresh, 2006; Fakhrunnisa *et al.*, 2006; Zehra *et al.*, 2017). Sin embargo, los resultados obtenidos de este estudio ponen de manifiesto que esta especie de *Trichoderma* presentó el tercer porcentaje más bajo de inhibición de las especies estudiadas. Si bien es cierto que, aunque esta especie no ha sido la mejor de las estudiadas, la capacidad de inhibición sobre el patógeno fue considerablemente buena, colonizando este gran parte del medio de cultivo e impidiendo el desarrollo del patógeno.

En el caso de *F. sambucinum*, la mayoría de los aislados de *Trichoderma* consiguieron controlar el crecimiento en cultivo dual. Se apreció un importante desarrollo de *T. hamatum* (T311), *T. spirali* (T314) y *T. gamsii* (T327) que fueron capaces de crecer sobre el patógeno frenando el desarrollo del mismo. Cabe destacar también la buena aptitud de *T. hamatum* (T324) y *T. harzianum* (T329) en el control de *F. sambucinum*. Ocurrió que al igual que con *F. oxysporum*, *T. rossicum* (T328) fue el aislamiento con menor potencial de control sobre el patógeno. En estudios realizados por Aydin (2018) las cepas más eficientes para el control de este patógeno fueron *T. atroviride*, *T. gamsii*, *T. hamatum* y *T. viride* que crecieron sobre el patógeno, inhibiendo la colonia. Algunos aislamientos de *Trichoderma* de este estudio demostraron capacidades de hiperparasitismo fuertes o muy fuertes, cubriendo completamente al patógeno. *T. hamatum* y *T. gamsii* fueron los más rápidos y efectivos en el control del patógeno, provocado por el micoparasitismo y a la producción de enzimas y antibióticos (Maciel *et al.*, 2014; Aydin, 2018). En estudios realizados con *Trichoderma* spp. y *Bacillus subtilis* para el control de *F. sambucinum* mediante confrontación directa fueron efectivos en la inhibición del crecimiento del patógeno, aunque en el caso de *Trichoderma* spp fue mayor y en el caso de *B. subtilis* el patógeno creció hasta acercarse al agente donde se produjo una interrupción del crecimiento, presentándose un halo de inhibición entre ambos hongos (Maciel *et al.*, 2014).

En el caso de otra especie de *Fusarium*, todas las cepas de *Trichoderma* redujeron considerablemente el crecimiento de *F. culmorum* en el ensayo de confrontación directa, inhibiendo el crecimiento micelial y reduciendo el diámetro de la colonia o bien presentando una zona de inhibición entre ambos hongos por el antagonista (Blaszczyk *et al.*, 2017; Tamandegani *et al.*, 2020). En las tres especies de *Fusarium* analizadas en este estudio, fue *F. culmorum* donde se obtuvieron porcentajes de inhibición más elevados. Cabe destacar que el aislado de *Trichoderma* que obtuvo el porcentaje más bajo en los otros aislados del patógeno, fue significativamente superior a los más bajos obtenidos en los otros dos cultivos duales, siendo 35,94 % presentado por *T. rossicum* (T316). Los



aislados de *T. hamatum* (T311 y T324) fueron los que mejores aptitudes demostraron en el control *in vitro* de *F. culmorum*, como en el estudio realizado por Blaszczyk *et al.* (2017) que fueron las especies *T. viride*, *T. harzianum* y *T. hamatum* las que mejor controlaron al patógeno. Si bien es cierto que *Trichoderma* presentó valores más bajos de inhibición en especies del patógeno transmitidas por el suelo como *F. culmorum* (Tamandegani *et al.*, 2020).

Como ya se mencionó anteriormente, los porcentajes de inhibición más elevados en este ensayo se obtuvieron con *F. culmorum* presentando valores medios de todos los aislados de *Trichoderma* aproximadamente del 54 % frente al 32 % de *F. sambucinum* y el 33 % de *F. oxysporum*. Casualmente *F. culmorum* fue la especie más virulenta de las estudiadas, por lo que los altos porcentajes de inhibición frente a los de otras especies de *Fusarium* podrían deberse a que la actividad antagonista *in vitro* de *Trichoderma* puede estar determinada por las diferentes interacciones antagonista-patógeno que serían únicas y específicas para cada cepa y que también podrían estar condicionadas por las condiciones experimentales (Blaszczyk *et al.*, 2017).

Enzimas, metabolitos y proteínas producidas por *Trichoderma* en el medio de cultivo inhiben el crecimiento de hongos fitopatógenos, es por ello que se utilizó el ensayo de membranas para evaluar la capacidad antifúngica de los diferentes aislados de *Trichoderma* (Elad *et al.*, 1982; Elad, 2000; Mayo-Prieto *et al.*, 2020).

En el ensayo de membranas realizado se demostró que la mayoría de los aislados de *Trichoderma* consiguieron inhibir el crecimiento del patógeno. Se apreciaron diferencias en la inhibición entre las distintas especies *Trichoderma* e incluso entre cepas de la misma especie, así como entre las diferentes especies de *Fusarium*. Esto se puede deber a la capacidad de las distintas especies de *Trichoderma* de producir enzimas, antibióticos y otros compuestos volátiles sobre la membrana y también de la susceptibilidad del patógeno (Quiroz-Sarmiento *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2013). Observando la inhibición del patógeno y que las membranas de celofán junto con los discos de *Trichoderma* fueron retiradas a las 48 horas de su cultivo, se pone de manifiesto la rapidez de desarrollo de *Trichoderma* spp. y su capacidad de producir metabolitos antifúngicos en un corto periodo de tiempo. Esta característica ya fue descrita por Díaz *et al.* (2012) que observó la producción de metabolitos con efectividad inhibitoria del patógeno a los 3 días de cultivo. Las características de los metabolitos producidos por *Trichoderma* dependen de la edad de la colonia, produciéndose un pico a los 7-10 días (Kundu *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2013). Por lo que como ya apuntó Díaz *et al.* (2012) se podría aumentar la inhibición del crecimiento del patógeno aumentando el tiempo de cultivo de *Trichoderma* sobre la membrana de celofán. En los ensayos de membranas realizados en este trabajo, *T. gamsii* (T327) fue el aislado que produjo mejores efectos inhibidores frente a las tres especies de *Fusarium* estudiadas. En ensayos realizados por Álvarez-García *et al.* (2020) y Mayo-Prieto *et al.* (2020),



los metabolitos producidos por *T. gamsii* controlaron el desarrollo de *Rhizoctonia solani* y de *F. oxysporum*. También coincide con lo obtenido por Anees *et al.* (2010), donde en los ensayos de membrana con *T. gamsii*, las que inhibieron el crecimiento de *R. solani* en más de un 50 % y representando la mayor inhibición producida. En el ensayo de membranas realizado Mayo *et al.* (2015) *T. gamsii* fue el segundo aislado de *Trichoderma* que mejor consiguió inhibir el crecimiento de *R. solani*. Según Anees *et al.* (2010) esta cepa de *Trichoderma* es un buen productor de metabolitos solubles en agua que inhiben el crecimiento del patógeno y además de estar relacionada con la inducción de la resistencia a la enfermedad en las plantas.

En el caso de *F. oxysporum*, los aislados de *Trichoderma* que demostraron una mayor actividad inhibidora del patógeno fueron *T. virens* (T312 y T317) y *T. brevicompactum* (T323). En otros trabajos se demostró la capacidad inhibidora *in vitro* de estas especies frente a *Fusarium* y otros patógenos como *R. solani*, *B. cinerea*, *S. sclerotiorum*, etc (Campelo *et al.*, 2010; Mayo, 2010; Mayo-Prieto *et al.*, 2020). En el caso de *F. sambucinum* se alcanzaron los mayores porcentajes de inhibición, superiores al 70 % alcanzado por *T. gamsii* (T327). Este patógeno tuvo dificultades para desarrollarse llegando incluso a no crecer nada en algunas repeticiones. Y por último, en el control de *F. culmorum*, los mayores porcentajes de inhibición se alcanzaron por *T. hamatum* (T311 y T324), *T. gamsii* (T327) y *T. brevicompactum* (T323). Por el contrario, los peores porcentajes de inhibición de *Fusarium* fueron alcanzados por *T. rossicum* (T316 y T328) y *T. harzianum* (T329), incluyéndose *T. spirale* (T319) en el caso de *F. culmorum*. *T. harzianum* es una especie con alta capacidades de inhibición en otros ensayos realizados por otros autores, lo que contrasta con los resultados obtenidos en este estudio, en el que este aislado es uno de los que menos controla al patógeno llegando incluso a no tener efecto inhibidor frente a *F. culmorum* (Ruano-Rosa *et al.*, 2010; Díaz *et al.*, 2013; Sánchez-García *et al.*, 2017; Álvarez-García *et al.*, 2020). El patógeno *F. culmorum* presentó un fuerte crecimiento en las placas en las que se sembró *T. rossicum* (T328), *T. harzianum* (T329) y *T. spirale* (T319), donde se dieron porcentajes de inhibición de 0% y donde el patógeno ocupó toda la placa. Esto pone de manifiesto que los metabolitos producidos por estos aislados no tuvieron ningún efecto inhibidor frente a este patógeno y por lo tanto no serían opción para el control biológico del mismo.

Es posible que otras cepas de *Trichoderma* no incluidas en este estudio pudieran ser efectivas en el control de *F. culmorum*, *F. oxysporum* y *F. sambucinum*, así como en estudios como el realizado por Sánchez-García *et al.* (2017) donde comprobaron que *T. asperellum* inhibió el crecimiento de *F. solani* y en otro estudio realizado por Díaz *et al.* (2012) donde *T. atroviride* tuvo efecto inhibidor significativo contra *Fusarium*.

Las diferencias obtenidas entre los diferentes ensayos realizados se pueden deber a aspectos esenciales como el crecimiento, la esporulación y otros factores específicos como el biocontrol,



determinados por la variabilidad de genotipos empleados que conlleva diferentes modos de acción de las cepas evaluadas. La falta de contacto entre el patógeno y el antagonista que reduce la estimulación de la actividad de control, puede ser responsable de las diferencias de inhibición de los antagonistas entre el cultivo dual y el cultivo de membranas (Ruano-Rosa *et al.*, 2010).

Se observó que ciertas cepas de *Trichoderma* tuvieron mayor esporulación que otras. Una alta esporulación sería indicativo de la alta capacidad productiva que se traduciría en una alta colonización del cultivo y por lo tanto un buen control del patógeno (Benítez *et al.*, 2004; Ruano-Rosa *et al.*, 2010).

Los ensayos realizados constituyen sólo un estudio preliminar, siendo necesario testarlos en condiciones de invernadero y en campo para la selección de aislados de *Trichoderma* que contribuyan al control de *Fusarium* spp en el cultivo del lúpulo.



## 6. CONCLUSIONES

Los aislados autóctonos de *Trichoderma* inhiben el crecimiento de *Fusarium* spp.

*T. gamsii* (T327) es el aislado que mejores efectos inhibidores presenta tanto por el efecto de sus metabolitos como por su competición directa frente a los aislamientos de *Fusarium* evaluados.

*T. hamatum* (T311 y T324) muestra buena capacidad de control, siendo capaz de sobrecrecer al patógeno cuando se enfrentan en competición directa.

*T. rossicum* (T316 y T328) y *T. harzianum* (T329) presentan en general bajos porcentajes de inhibición.

*F. culmorum* es el patógeno con mayor velocidad de crecimiento que sólo es inhibido en competición directa con *Trichoderma*.

*F. sambucinum* es el patógeno más controlado por el efecto de los metabolitos secretados por *Trichoderma* siendo eficiente su control sin necesidad de la presencia del agente de biocontrol.

En cuanto a *F. oxysporum*, sin obtener los mejores porcentajes de inhibición en los ensayos realizados, *Trichoderma* fue capaz de inhibir su crecimiento con valores óptimos para un correcto control biológico.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. (2002) *Fitopatología*. Limusa. doi:10.7764/rcia.v31i2.1305.
- 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), pp. 1-10. doi:10.3390/jof6030176.
- Alves-Santos, F. M., Benito, E. P., Eslava, A. P. y Díaz-Mínguez, J. M. (1999) "Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain", *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), pp. 3335-3340. Disponible en: <http://aem.asm.org/> (Accedido: 17 de octubre de 2020).
- Alves-Santos, F. M. y Diez, J. J. (2011) *Control of Fusarium diseases*. Editado por F. M. Alves-Santos y J. J. Diez. Kerala, India: Research Signpost.
- 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*. Elsevier, 114(9), pp. 691-701. doi:10.1016/j.funbio.2010.05.007.
- Aydin, M. H. (2018) "Evaluation of some *Trichoderma* species in biological control of potato dry rot caused by *Fusarium sambucinum* Fuckel isolates", *Applied Ecology and Environmental Research*, 17(1), pp. 533-546. doi:10.15666/aeer/1701\_533546.
- 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:10.2436/im.v7i4.9480.
- Bissett, J., Gams, W., Jaklitsch, W. y Samuels, G. J. (2015) "Accepted *Trichoderma* names in the year 2015", *IMA Fungus*. International Mycological Association, 6(2), pp. 263-295. doi:10.5598/ima fungus.2015.06.02.02.
- Błaszczak, L., Basińska-Barczak, A., Ćwiek-kupczyńska, H., Gromadzka, K., Popiel, D. y Stepień, L. (2017) "Suppressive effect of *Trichoderma* spp. on toxigenic *Fusarium* species", *Polish Journal of Microbiology*, 66(1), pp. 85-100.
- Breuer, T. (1985) "El cultivo del lúpulo en España: desarrollo espontáneo y regulación orientada hacia la demanda", *Paralelo 37*, (8), pp. 117-136. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1456723>.
- Campelo, P., Cardoza, R. E., Lorenzana, A., Hermosa, M. R., Monte, E., Reinoso, B., Gutierrez, S. y Casquero, P. A. (2010) "Biological control of phytopathogenic fungi in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma virens*", *Annual report of the bean improvement*



*cooperative*, 53, pp. 114-115.

Campelo Rodríguez, M. P., Lorenzana de la Varga, A., Gómez-Bernardo Villar, E. y Palomo Gómez, J. L. (2004) "*Sphaerotheca humuli* (DC. ) Burrill", en *Fichas de Diagnóstico en Laboratorio de Organismos Nocivos de los Vegetales*. Salamanca: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación-Sanidad Vegetal, p. 263.

Campelo Rodríguez, M. P., Lorenzana de la Varga, A., Marcos Fernández, M. F. y Palomo Gómez, J. L. (2011) "*Pseudoperonospora humuli* (Miyabe & Takah.) G.W. Wilson", en *Fichas de Diagnóstico en Laboratorio de Organismos Nocivos de los Vegetales*. Salamanca: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación- Sanidad Vegetal, p. 380.

Chet, I. y Inbar, J. (1994) "Biological control of fungal pathogens", *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Humana Press, 48(1), pp. 37-43. doi:10.1007/BF02825358.

Díaz, G., Córcoles, A. I., Asencio, A. D. y Torres, M. P. (2013) "*In vitro* antagonism of *Trichoderma* and naturally occurring fungi from elms against *Ophiostoma novo-ulmi*", *Forest Pathology*. Editado por M.-S. Kim. John Wiley & Sons, Ltd, 43(1), pp. 51-58. doi:10.1111/j.1439-0329.2012.00792.x.

Dubey, S. C. y Suresh, M. (2006) "Randomly amplified polymorphic DNA markers for *Trichoderma* species and antagonism against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* causing chickpea wilt", *Journal of Phytopathology*, 154(11-12), pp. 663-669. doi:10.1111/j.1439-0434.2006.01167.x.

Elad, Y. (2000) "Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action", *Crop Protection*, 19(8-10), pp. 709-714. doi:10.1016/S0261-2194(00)00094-6.

Elad, Y., Chet, I. y Henis, Y. (1982) "Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*", *Canadian Journal of Microbiology*. Canadian Science Publishing, 28(7), pp. 719-725. doi:10.1139/m82-110.

Fakhrunnisa, Hashmi, M. H. y Ghaffar, A. (2006) "*In vitro* interaction of *Fusarium* spp., with other fungi", *Pakistan Journal of Botany*, 38(4), pp. 1317-1322.

FAO (2018) *FAOSTAT- Base de datos de cultivos*, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Accedido: 17 de marzo de 2020).

Fauna Europaea (2020) *Fauna Europaea, European Animal species Biodiversity*. Disponible en: <https://fauna-eu.org/> (Accedido: 6 de noviembre de 2020).

Gent, D. H., Barbour, J. D., Dreves, A. J., James, D. G., Parker, R., Walsh, D. B. y O'neal, S. (2010)



*Field guide for integrated pest management in hops*. Second Edi. Editado por S. O'Neal. Prosser, WA: Graphic Design.

González, I., Infante, D., Peteira, B., Martínez, B., Arias, Y., González, N. y Miranda, I. (2011) "Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma* spp. promisorios como agentes de control biológico. II. Expresión de la actividad glucanasa", *Revista de Protección Vegetal*, 26(1), pp. 23-29.

Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. y Monte, E. (2012) "Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes", *Microbiology*, 158(1), pp. 17-25. doi:10.1099/mic.0.052274-0.

Hjeljord, L. y Tronsmo, A. (1998) *Trichoderma and Gliocladium in biological control: an overview*, *Trichoderma and Gliocladium Vol 2*. Editado por G. E. Harman y C. P. Kubicek.

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.

International Mycological Association (2020) *Mycobank database. Fungal databases nomenclature & species banks, Mycobank database*. Disponible en: [https://www.mycobank.org/page/Simple names search](https://www.mycobank.org/page/Simple%20names%20search) (Accedido: 6 de noviembre de 2020).

Kubicek, C. P. y Harman, G. E. (2002) *Trichoderma and Gliocladium volume 1: basic biology, taxonomy and genetics*. Editado por C. P. Kubicek y G. E. Harman. London: Taylor & Francis.

Kundu, A., Chakraborty, M. R. y Chatterjee, N. C. (2008) "Biocontrol of wood decay by *Trichoderma* spp. Retrospect and prospect", *Asian J. Exp. Sci*, 22(3), pp. 373-384.

Lizotte, E., Hodgson, E. y Filotas, M. (2019) *Exploración del lúpulo. Guía de bolsillo para la región superior del medio oeste y el noreste de Estados Unidos y del este de Canadá*. Editado por J. R. Surrine. MSU Extension Bulletin.

Lorenzana, A., De Mendoza, H., Magadán, J. A. y Seco, M. V. (2005) "Estimating hop parameters prior to calculating economic thresholds of intervention against *Phorodon humuli* (Hemiptera: Aphididae)", *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. Headley Brothers Ltd, 80(6), pp. 689-692. doi:10.1080/14620316.2005.11511999.

Lorenzana de la Varga, A., Campelo Rodríguez, M. P., Gómez-Bernardo Villar, E. y Palomo Gómez, J. L. (2004) "*Phorodon humuli* Schrank", en *Fichas de Diagnóstico en Laboratorio de Organismos Nocivos de los Vegetales*. Salamanca: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación-Sanidad Vegetal, p. 225.

Lúpulos de León SAT (2020) *Proceso cultivo del lúpulo – Lúpulos de León*. Disponible en:



<https://www.lupulosdeleon.es/proceso-cultivo-del-lupulo/> (Accedido: 17 de noviembre de 2020).

Maciel, C. G., Walker, C., Briao Muniz, M. F. y Machado Araújo, M. (2014) "Antagonismo de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* (UFV3918) a *Fusarium sambucinum* em *Pinus elliottii* ENGELM", *Revista Árvore*, 38(3), pp. 505-512. doi:10.1590/S0100-67622014000300013.

Magadán Marcos, J. A., Olmedo Nadal, J. L., Piñeiro Andión, J., Valladares Alonso, J., García Pedreira-Ramisquido, J. M. y Fernández Paz, J. (2011) *Guía del cultivo del lúpulo, Lúpulo tecnología de Galicia*. S.A.E. Fomento del Lúpulo. doi:10.1007/s00425-007-0638-4.

Mansour, T. A., Nida, Y. A. y Suleman, P. (2008) "Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*", *Crop Protection*. Elsevier, 27(10), pp. 1354-1359. doi:10.1016/j.cropro.2008.05.007.

MAPA (2018) *Anuario de estadística del MAPA 2018, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación*. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/2018/default.aspx?parte=3&capitulo=07> (Accedido: 25 de julio de 2020).

MAPA (2020a) *Estadística anual de consumo de productos fitosanitarios y estadística quinquenal de utilización de productos fitosanitarios en la agricultura, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación*. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/estadisticas-medios-produccion/fitosanitarios.aspx> (Accedido: 27 de octubre de 2020).

MAPA (2020b) *Lúpulo, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación*. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/cultivos-herbaceos/lupulo/> (Accedido: 30 de julio de 2020).

MAPA (2020c) *Registro de productos fitosanitarios, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación*. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/productos/conregnom.asp> (Accedido: 26 de octubre de 2020).

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. (2010) *Efectos de Trichoderma en el control biológico de hongos fitopatógenos de alubia (Phaseolus vulgaris L.) y en el desarrollo de la planta, Trabajo Fin de Máster*. Universidad de León.



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*. Frontiers Research Foundation, 6(685), pp. 1-11. doi:10.3389/fpls.2015.00685.

Melgarejo Nárdiz, P., García-Jiménez, J., Jordá Gutiérrez, M. C., López González, M. M., Andrés Yebes, M. F. y Duran-Villa, N. (2010) *Patógenos de plantas descritos en España*. 2ª edición, *Sociedad Española de Fitopatología*. 2ª edición. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.

Michel-Aceves, A. C., Hernández-Morales, J., Toledo-Aguilar, R., Sabino López, J. E. y Romero-Rosales, T. (2019) "Antagonistic capacity of native *Trichoderma* spp. against *Phytophthora parasitica* and *Fusarium oxysporum* isolated from roselle crops", *Revista Fitotecnia Mexicana*, 42(3), pp. 235-241. doi:10.35196/rfm.2019.3.235-241.

Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M. y Kenerley, C. M. (2013) "Trichoderma research in the genome era", *Annual Review of Phytopathology*. Annual Reviews, 51, pp. 105-129. doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102353.

Neve, R. A. (1991) *Hops*. Suffolk: British Library Cataloguing in Publication Data.

Ocamb, C. M. y Bienapfl, J. C. (2009) *Compendium of hop pests and diseases*. Editado por W. F. Mahaffee, S. J. Pethybridge, y D. H. Gent. The American Phytopathological Society.

Porteous Álvarez, A. J., Lorenzana de la Varga, A., Rodríguez González, Á., Reinoso Sanchez, B., Gómez-Bernardo Villar, E. M., Carro Huerga, G., Campelo Rodríguez, M. P., Casquero Luelmo, P. A., Álvarez García, S., del Ser Herrero, S. y Mayo Prieto, S. (2019) *Enfermedades y plagas: lúpulo*, *Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales*. Editado por S. Mayo Prieto y P. A. Casquero Luelmo. León.

Quiroz-Sarmiento, V. F., Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A. y Lara Hernández, M. E. (2008) "In vitro antagonism of *Aspergillus* and *Trichoderma* strains against garlic-pathogenic filamentous fungi", *Revista Mexicana de Micología*, 26, pp. 27-34.

Ruano-Rosa, D., del Moral-Navarrete, L. y Lopez-Herrera, C. J. (2010) "Selection of *Trichoderma* isolates antagonistic to *Rosellinia necatrix*", *Spanish Journal of Agricultural Research*, 8(4), pp. 1084-1097. doi:10.5424/sjar/2010084-1403.

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*, 38(2), pp. 308-310.

Samuels, G. J. (1996) "*Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus", *Mycological Research*. Elsevier B.V., 100(8), pp. 923-935. doi:10.1016/S0953-7562(96)80043-8.

Sánchez-García, B. M., Espinosa-Huerta, E., Villordo-Pineda, E., Rodríguez-Guerra, R. y Mora-Avilés, M. A. (2017) "*Trichoderma* spp. native strains molecular identification and *in vitro* antagonistic evaluation of root phytopathogenic fungus of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Montcalm", *Agrociencia*, 51, pp. 63-79.

Schmoll, M. y Schuster, A. (2010) "Biology and biotechnology of *Trichoderma*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), pp. 787-799. doi:10.1007/s00253-010-2632-1.

Sempere Ferre, F. y Santamarina, M. P. (2010) "Efficacy of *Trichoderma harzianum* in suppression of *Fusarium culmorum*", *Annals of Microbiology*, 60(2), pp. 335-340. doi:10.1007/s13213-010-0047-y.

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.

De Souza Ramos, A., Batista Fiaux, S. y Gomes Ferreira Leite, S. (2008) "Production of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone by *Trichoderma harzianum* in solid-state fermentation", *Brazilian Journal of Microbiology*. SBM, 39(4), pp. 712-717. doi:10.1590/S1517-83822008000400022.

Tamandegani, P. R., Marik, T., Zafari, D., Balázs, D., Vágvölgyi, C., Szekeres, A. y Kredics, L. (2020) "Changes in peptaibol production of *Trichoderma* species during *in vitro* antagonistic interactions with fungal plant pathogens", *Biomolecules*, 10(730), pp. 1-19. doi:10.3390/biom10050730.

Tello Marquina, J. C. y La Casa Plasencia, A. (1990) *Fusarium oxysporum en los cultivos intensivos del litoral mediterráneo de España. Fases parasitaria (fusariosis vasculares del tomate y del clavel) y no parasitaria*. Editado por J. C. Tello Marquina y A. La Casa Plasencia. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Weindling, R. (1932) "*Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi", *Phytopathology*, 22(10), pp. 837-845.

Weindling, R. (1934) "Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi", *Phytopathology*, 24(11), pp. 151-153.



Zehra, A., Dubey, M. K., Meena, M. y Upadhyay, R. S. (2017) "Effect of different environmental conditions on growth and sporulation of some *Trichoderma* species", *Journal of Environmental Biology*, 38(2), pp. 197-203. doi:10.22438/jeb/38/2/MS-251.

Zhang, R. y Wang, D. (2012) "*Trichoderma* spp. from rhizosphere soil and their antagonism against *Fusarium sambucinum*", *African Journal of Biotechnology*, 11(18), pp. 4180-4186. doi:10.5897/ajb11.3426.