



RÍO NEGRO
UNIVERSIDAD NACIONAL



Evaluación del cultivo *in vitro* de variedades nacionales de lúpulo (*Humulus lupulus*) como una alternativa a la propagación agámica tradicional

Autora: Di Sario, Luciana

Directora: Dra. Boeri, Patricia A.

Co-director: Mg. Rado, Pablo L.

Universidad Nacional de Río Negro

Sede Alto Valle – Valle Medio

Trabajo Final de Grado – Investigación

Ingeniería en Biotecnología

Villa Regina, 2022

TFG: Evaluación del cultivo *in vitro* de variedades nacionales de lúpulo (*Humulus lupulus*) como una alternativa a la propagación agámica tradicional

Título: Evaluación del cultivo *in vitro* de variedades nacionales de lúpulo (*Humulus lupulus*) como una alternativa a la propagación agámica tradicional

Datos de la Estudiante: Luciana Di Sario. Ingeniería en Biotecnología. Sede Alto Valle y Valle Medio, Universidad Nacional de Río Negro (UNRN).

Datos de la Directora: Dra. Boeri Patricia A. Universidad Nacional de Río Negro, Centro de Investigación y Transferencia (CIT-UNRN-CONICET).

Datos del Co-director: Mg. Rado Pablo L., Universidad Nacional de Río Negro (UNRN)

Año:2022

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SIGLAS	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	5
AGRADECIMIENTOS	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Características del lúpulo (<i>Humulus lupulus</i>) y usos	8
1.2. Producción de lúpulo	10
1.2.1. Cultivo nacional e internacional	10
1.2.2. Cultivo en Viedma, Río Negro	12
1.3. Métodos de propagación	13
1.3.1. Propagación tradicional y contrariedades	13
1.3.2. Micropropagación y su aplicación en lúpulo	14
1.4. Semillas sintéticas	17
2. HIPÓTESIS	18
2.1. Hipótesis general	18
2.2. Hipótesis específicas	18
3. OBJETIVOS	19
3.1. Objetivo general	19
3.2. Objetivos específicos	19
4. METODOLOGÍA	19
4.1. Lugar de trabajo y sitios de muestreo	19
4.2. Selección de las plantas madres	20
4.3. Inicio del cultivo de tejidos <i>in vitro</i>	21
4.3.1. Desinfección del material vegetal	21

TFG: Evaluación del cultivo *in vitro* de variedades nacionales de lúpulo (*Humulus lupulus*) como una alternativa a la propagación agámica tradicional

4.3.1.1.	Desinfección para el aislamiento de meristemas	21
4.3.1.2.	Desinfección para el aislamiento de microestacas	21
4.3.2.	Selección y acondicionamiento de los explantes	23
4.3.3.	Caracterización morfológica del material vegetal	24
4.4.	Inducción de respuestas morfogénicas	24
4.4.1.	Meristemas	26
4.4.1.1.	Inducción de brotes múltiples	26
4.4.1.2.	Elongación de entrenudos	26
4.4.1.3.	Enraizamiento de brotes	27
4.4.2.	Microestacas procedentes del cultivo <i>in vitro</i>	28
4.4.2.1.	Enraizamiento de microestacas	28
4.5.	Aclimatación y rusticación de vitroplantas	28
4.6.	Obtención de semillas sintéticas	29
4.7.	Análisis estadístico	30
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
5.1.	Desinfección	30
5.1.1.	Desinfección para el aislamiento de meristemas	30
5.1.2.	Desinfección para el aislamiento de microestacas	31
5.2.	Inducción de respuestas morfogénicas	34
5.2.1.	Meristemas	34
5.2.1.1.	Inducción de brotes múltiples	34
5.2.1.2.	Elongación de entrenudos	37
5.2.1.3.	Enraizamiento de brotes	40
5.2.2.	Microestacas procedentes del cultivo <i>in vitro</i>	45
5.2.2.1.	Enraizamiento de microestacas	45
5.3.	Aclimatación y rusticación de vitroplantas	48

TFG: Evaluación del cultivo *in vitro* de variedades nacionales de lúpulo (*Humulus lupulus*) como una alternativa a la propagación agámica tradicional

5.4. Obtención de semillas sintéticas	49
6. CONCLUSIONES	55
7. RECOMENDACIONES	56
BIBLIOGRAFÍA	56
ANEXOS	68

ABREVIATURAS Y SIGLAS

½ MS	Medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) a la mitad de la concentración original
¼ MS	Medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) a un cuarto de la concentración original
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AG₃	Ácido giberélico
AIA	Ácido Indol-3-acético
ANOVA	Analysis of variance - Análisis de la varianza
BAP	6-bencilaminopurina
cm	Centímetros
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
°C	Grados centígrados
DBCA	Diseño en bloques completamente aleatorizado
g	Gramos
hs	Horas
IBA	Ácido Indol-3-butírico
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
l	Litros
M	Molar
m²	Metro cuadrado
ME	Medio de elongación
MIB	Medio de inducción de brotes
ml	Mililitros
NaClO	Hipoclorito de sodio
PPFD	Photosynthetic photon flux density
PTC	Plant tissue culture

TFG: Evaluación del cultivo *in vitro* de variedades nacionales de lúpulo (*Humulus lupulus*) como una alternativa a la propagación agámica tradicional

seg	Segundos
SINAVIMO	Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de plagas
SS	Semillas sintéticas
v/v	volumen/volumen
μl	Microlitros
μM	Micromolar
μmol	Micromol

RESUMEN

El lúpulo (*Humulus lupulus* L.) es una planta de la familia *Cannabaceae* que se caracteriza por ser trepadora, con crecimiento en altura. La distribución geográfica óptima en ambos hemisferios para su crecimiento se encuentra entre las latitudes 35° y 55°, región en la que se encuentra la ciudad de Viedma, provincia de Río Negro. Dado que la atracción del cultivo radica en la producción de conos (inflorescencias femeninas), que son utilizados principalmente como saborizantes y aromatizantes en la producción de cerveza, la industria concentra su demanda en las plantas femeninas, lo cual excluye la posibilidad de propagación a través de las semillas. Por ello, el lúpulo se multiplica casi exclusivamente de forma asexual, a través de rizomas o esquejes nodales, lo que representa una desventaja para los productores locales en términos de calidad del material y de costos de producción, debido a que estas prácticas, sostenidas en el tiempo, favorecen la dispersión y acumulación de infecciones virales y fúngicas. Por otra parte, en la actualidad, el cultivo de las variedades nacionales no sólo ha quedado relegado, sino que, junto a las variedades importadas, no se ajustan a las demandas y necesidades del mercado nacional. En este contexto, el presente proyecto tuvo como objetivo evaluar las respuestas al cultivo de tejidos *in vitro* de tres variedades nacionales de lúpulo, Mapuche, Nahuel y Traful, con el fin de proporcionar las primeras bases del conocimiento sobre la propagación de éstas a través de la biotecnología vegetal, en vista de satisfacer las demandas actuales del sector cervecero. Así, se evaluaron las respuestas al CTV de dos tipos de explantes: meristemas y secciones nodales. Se logró establecer una metodología eficiente de desinfección del material vegetal que permitió el cultivo de meristemas en el medio nutritivo de Murashige y Skoog (MS), a la mitad de la concentración original, adicionado con diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento. A pesar de que se utilizaron medios adicionados con citocininas para inducir la formación de brotes múltiples (BAP 0,88 μM), esta respuesta morfogénica no fue obtenida. No obstante, este medio permitió la diferenciación de los meristemas en brotes, que luego elongaron cuando fueron transferidos a un medio con giberelinas (AG₃ 2,89 μM). Adicionalmente, se logró el enraizamiento de estos brotes en dos etapas de cultivo: una primera con IBA (2,46 μM) y BAP (0,88 μM), y luego con IBA (9,84 μM) y 2,4-D (0,45 μM). Sin embargo, los medios auxínicos no resultaron imprescindibles para la formación de raíces, debido a que también se registraron algunos eventos de rizogénesis en medios libres de auxinas. Asimismo, en el cultivo de meristemas se observó que, conforme aumentó el tiempo de incubación, y con ello la exposición de los tejidos a distintos reguladores de crecimiento, la formación de callo se incrementó, así como también los eventos de organogénesis indirecta.

Por otra parte, si bien no se logró ajustar un protocolo eficiente de desinfección para las secciones nodales, se obtuvo entre un 5 y 20% de explantes libres de contaminación, que permitieron avanzar con el cultivo de tejidos, y disponer de material estéril, que luego fue multiplicado exitosamente. Así, en el cultivo microestacas procedentes de material *in vitro*, se observó entre un 30 y 70% más de secciones nodales enraizadas en medio libre de reguladores de crecimiento, respecto al cultivo en medio auxínico, lo que dependió de la variedad. La presencia de auxinas en el medio de cultivo promovió la formación de callos; sin embargo, en contraposición con la respuesta observada en el enraizamiento de brotes derivados de los meristemas diferenciados, en este caso prevaleció la organogénesis directa.

Adicionalmente, se realizaron semillas sintéticas a partir del encapsulamiento de meristemas, y se evaluó la influencia de diferentes tiempos de almacenamiento a 4°C, previo al cultivo de éstas en condiciones controladas de luz y temperatura (fotoperiodo de 16 hs luz/ 8 horas oscuridad y 21 ± 2°C). El medio de cultivo utilizado para la conversión fue MS a la mitad de la concentración original, suplementado con BAP (0,88 µM) y AG₃ (2,89 µM). Si bien las tres variedades de lúpulo respondieron favorablemente a esta biotécnica, sin haber obtenido la formación de callo, Mapuche fue la que registró mayores porcentajes de conversión, y algunos eventos de enraizamiento, que permitieron obtener plantas completas.

Por otra parte, se inició el proceso de aclimatación y rusticación de las vitroplantas obtenidas de los diferentes ensayos realizados durante la investigación, logrando un 100% de supervivencia.

En conclusión, este trabajo constituye el primer reporte sobre el establecimiento del cultivo *in vitro* de las variedades de lúpulo de origen argentino, Mapuche, Nahuel y Trafal. Asimismo, se logró establecer un protocolo para la obtención de semillas sintéticas mediante la encapsulación de meristemas, lo cual permitió avanzar hacia el establecimiento de nuevas metodologías de propagación agámica y conservación de estas variedades. No obstante, se deberán diseñar nuevos ensayos tendientes a optimizar la desinfección de los explantes, especialmente para las secciones nodales procedentes de campo, y aumentar los porcentajes de conversión y enraizamiento de plántulas obtenidas a partir de semillas sintéticas.

Palabras clave: cultivo de tejidos vegetales (CTV), organogénesis, semillas sintéticas, reguladores de crecimiento.

ABSTRACT

The hop (*Humulus lupulus* L.) is a plant of the *Cannabaceae* family that is characterised by being a climber, with a tall growth. The optimum geographical distribution in both hemispheres for its growth is between latitudes 35° and 55°, a region in which the city of Viedma, in the province of Río Negro, is located. Since the attraction of the crop lies in the production of cones (female inflorescences), which are mainly used as flavouring and aromatizing in beer production, the industry concentrates its demand on the female plants, which excludes the possibility of propagation via seeds. As a result, hops are almost exclusively multiplied asexually, through rhizomes or nodal cuttings, which represents a disadvantage for local producers in terms of material quality and production costs, because these practices, sustained over time, favour the spread and accumulation of viral and fungal infections. On the other hand, at present, the cultivation of national varieties has not only been relegated, but also, together with imported varieties, they don't fulfill demands and needs of the national market. In this context, the present project aimed to evaluate the responses of three national varieties of hops, Mapuche, Nahuel and Traful to *in vitro* tissue culture, in order to provide the first knowledge bases on their propagation through plant biotechnology, and to meet the current demands of the brewing sector. Thus, the responses to PTC of two types of explants were evaluated: meristems and nodal sections. An efficient methodology for disinfection of plant material was established which allowed the cultivation of meristems in Murashige and Skoog (MS) nutrient medium, at half the original concentration, added with different combinations and concentrations of growth regulators. Although cytokinin-added (BAP 0.88 μM) media were used to induce multiple shoot formation, this morphogenic response was not obtained. However, this medium allowed the differentiation of meristems into shoots, which then elongated when transferred to medium with gibberellins (AG3 2.89 μM). Additionally, rooting of these shoots was achieved in two culture stages: first with IBA (2.46 μM) and BAP (0.88 μM), and then with IBA (9.84 μM) and 2,4-D (0.45 μM). However, auxin media were not essential for root formation, as some rhizogenesis events were also recorded on auxin-free media. Also, in the meristem culture, it was observed that, as incubation time increased, and with it the exposure of the tissues to different growth regulators, callus formation increased, as well as the events of indirect organogenesis.

On the other hand, although it was not possible to adjust an efficient disinfection protocol for the nodal sections, between 5 and 20% of explants were obtained free of contamination, which allowed us to advance with tissue culture, and to have sterile material, which was then successfully multiplied. Thus,

in the cultivation of microstakes from in vitro material, between 30 and 70% more nodal sections rooted in medium free of growth regulators were observed than in auxin medium, which depended on the variety. The presence of auxins in the culture medium promoted callus formation; however, in contrast to the response observed in the rooting of shoots derived from differentiated meristems, direct organogenesis prevailed in this case.

Additionally, synthetic seeds were made from the encapsulation of meristems, and the influence of different storage times at 4°C was evaluated prior to their cultivation under controlled light and temperature conditions (photoperiod of 16 h light/ 8 h dark and 21 ± 2°C). The culture medium used for conversion was MS at half the original concentration, supplemented with BAP (0.88 µM) and AG3 (2.89 µM). Although the three hop varieties responded favourably to this biotechnique, without having obtained callus formation, Mapuche was the one that registered the highest conversion percentages, and some rooting events, which made it possible to obtain complete plants.

On the other hand, the process of acclimatisation and rustication of the vitroplants obtained from the different trials carried out during the research was initiated, achieving 100% survival.

In conclusion, this work constitutes the first report on the establishment of in vitro cultivation of the Argentinean hop varieties Mapuche, Nahuel and Trafal. It was also possible to establish a protocol for obtaining synthetic seeds by encapsulation of meristems, which allowed progress to be made towards the establishment of new methodologies for agamic propagation and conservation of these varieties. However, new trials should be designed to optimise the disinfection of explants, especially for nodal sections from the field, and to increase the conversion and rooting percentages of seedlings obtained from synthetic seeds.

Keywords: plant tissue culture (PTC), organogenesis, synthetic seeds, growth regulators.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a la Universidad Nacional de Río Negro por darme la oportunidad de estudiar esta maravillosa carrera, y formarme como profesional.

A la Sede Atlántica de la Universidad Nacional de Río Negro, por abrirme las puertas de sus laboratorios para poder llevar a cabo mi trabajo final de grado (TFG).

A Patricia Boeri, mi directora de TFG, quien me dio la oportunidad de involucrarme en el mundo de la investigación, continuamente me abrió puertas, y siempre estuvo en este trayecto, aconsejándome y ayudándome en lo que necesitaba.

A Daniela Dalzotto, por dedicar parte de su tiempo a enseñarme, siempre estar ante cualquier consulta y aconsejarme.

Un especial agradecimiento a Cervecería y Maltería Quilmes S.A por su apoyo y buena predisposición para el desarrollo de las actividades de investigación realizadas en el marco del TFG.

Gracias a Lúpulo Bieder, y a Lúpulos del Atlántico, por haberme proporcionado las muestras necesarias para llevar a cabo esta investigación, y a la Asociación Civil de Cervecerías Artesanales de Viedma por el continuo interés en este proyecto.

Asimismo, agradecer particularmente a mi papá y a mi mamá, Marcos y Gilda, que me permitieron estudiar lejos de casa, siempre estuvieron con su apoyo incondicional, y me enseñaron a ir por más y no rendirme nunca.

A mis hermanos, Ramiro e Ignacio, que, a pesar de la distancia, siempre estuvieron acompañándome.

A mi siempre confiable prima, Victoria, que en todo momento me acompañó, aconsejó y compartió momentos a la distancia.

Gracias a toda mi gran familia, abuelos, tíos y primos, que siempre hicieron llegar su apoyo durante este trayecto, y en especial, a mi familia de Viedma, que me acompañó muy de cerca en esta etapa final, transmitiéndome su alegría por mis logros, y apoyándome en todo.

A todos mis amigos y compañeros que me han brindado ayuda en todos estos años de universidad, con los que compartí muchos momentos y horas de estudio.

A todos, gracias, sin ustedes esto no habría sido posible.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características del lúpulo (*Humulus lupulus*) y usos

El lúpulo (*Humulus lupulus* L.) es una planta de la familia *Cannabaceae* (Orden Urticales) que se caracteriza por ser trepadora con crecimiento en altura, alcanzando hasta 6 metros de longitud. Debido a que posee un fuerte fototropismo, la región geográfica en ambos hemisferios óptima para su crecimiento (Figura 1), se encuentra entre las latitudes 35° y 55° (Rizzi y Tarazi, 2018; Doods, 2017; Braam, 2005). Allí, predominan las zonas frías, el clima en verano es templado, con temperaturas que varían entre los 16°C y 18°C, y los días presentan mayor cantidad de horas de luz durante la primavera/verano, lo que permite un desarrollo exitoso del lúpulo durante la fase vegetativa, aumentando así los rendimientos (Nievas *et al.*, 2021; Del Valle *et al.*, 2003; Verzele y Keukeleire, 1991).



Figura 1. Región geográfica óptima para el cultivo de lúpulo. Fuente: Nievas *et al.* (2021)

En el período de otoño/invierno, el lúpulo pierde sus partes aéreas y conserva sólo el rizoma, a través del cual se realiza la reproducción asexual (Dodds, 2017). Éste es un órgano de almacenamiento que brota anualmente por un período de 12 a 15 años (Magadan, 2011); sin embargo, si las condiciones de crecimiento son óptimas, su vida útil puede extenderse hasta los 25 años (Morton, 2013). En primavera comienza el ciclo vegetativo de la planta, y a partir de allí, se encuentra en activo crecimiento hasta su floración a fines del verano (Figura 2). Por ello, se considera que el lúpulo es una planta perenne en su parte subterránea y anual en su parte aérea (Nievas *et al.*, 2021). Por otra parte, este cultivo se

caracteriza por presentar tigmotropismo, dado que los tallos poseen tricomas que le permiten trepar en tutores verticales y enrollarse sobre ellos (Nievas *et al.*, 2021; Dodds, 2017; Mc Cormack, 2006; Kneen, 2003). Asimismo, esta especie presenta una gran dominancia apical, por lo que su desarrollo vertical es muy rápido, pudiendo alcanzar un crecimiento de hasta 30 cm/día (Kneen, 2003). Cuando las ramas laterales comienzan a crecer, sobre las cuales se dará la floración, la elongación comienza a detenerse (Magadan, 2011).

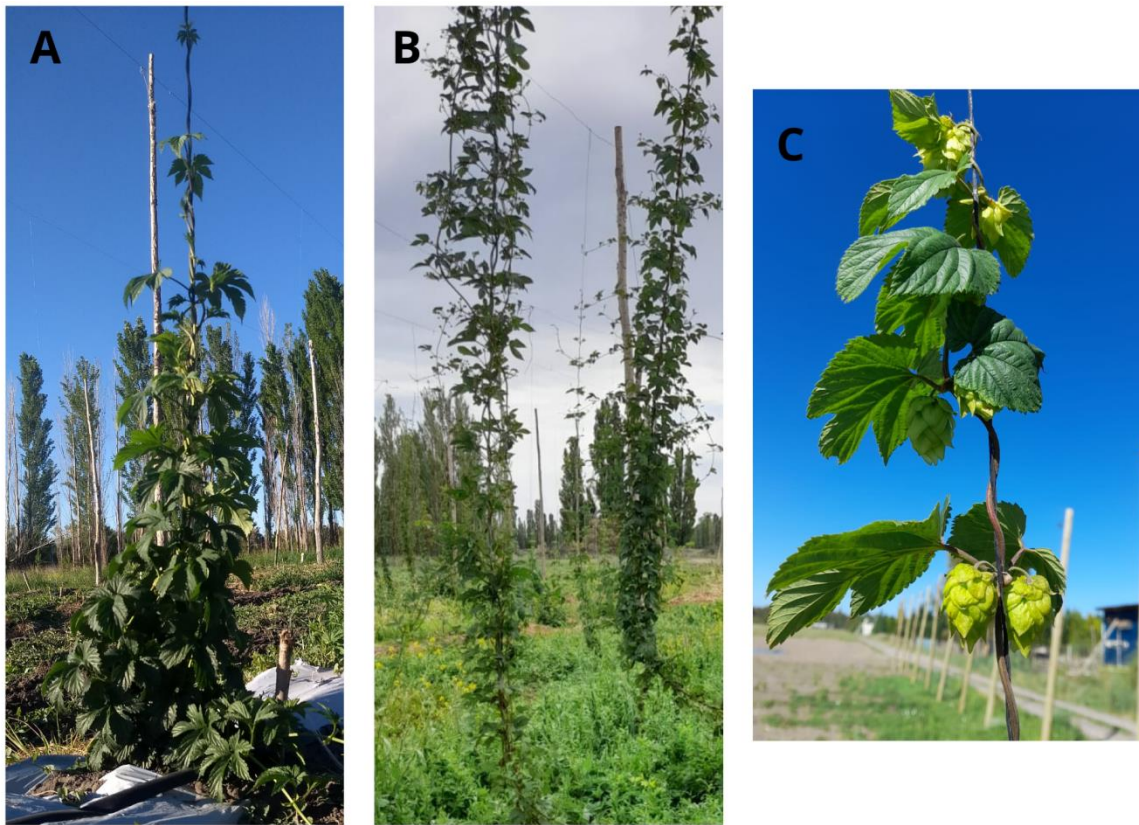


Figura 2. A. Lúpulo en estado vegetativo var. *cascade*. Octubre 2021; B. Lúpulo alzando su máxima altura. Diciembre 2021; C. Conos de var. *bullion*. Noviembre 2021

El lúpulo es una especie dioica, es decir, presenta las flores femeninas y masculinas en diferentes pies, lo que podría condicionar su reproducción sexual a la polinización cruzada. La floración, generalmente, inicia a mediados de diciembre, cuando la duración del día comienza a disminuir (Hiller, 2019), y ésta se prolonga durante diez días, momento en el que comienza la maduración de las flores, hasta la época de cosecha (fines de febrero o marzo) (Benedetto, 2019; Magadan, 2011). Las plantas femeninas son las de mayor atracción y las que se cultivan debido a que éstas producen conos (inflorescencias) sobre los brotes terminales de las ramas laterales (Sirrinc, 2010), los cuales. Éstos son de gran interés para la

industria cervecera, que demanda el 97% del lúpulo cultivado en el mundo, y en menor escala para la alimentaria y farmacológica (Raiser, 2011). Los conos se caracterizan por contener glándulas que producen lupulina, un polvo amarillo resinoso compuesto de metabolitos secundarios, entre los que se encuentran ácidos amargos, aceites esenciales y taninos, que contribuyen en diferentes aspectos en la elaboración de la cerveza y constituyen la principal materia prima (Nievas *et al.*, 2021; Machado *et al.*, 2019; Oladokuna *et al.*, 2016; SINAVIMO, s.f.). Las diversas variedades de lúpulo son las responsables de los sabores y aromas característicos de los diferentes tipos de cerveza, ya que el porcentaje de ácidos (α y β - ácidos) determina el amargor, y la presencia de diversos metabolitos secundarios pueden dar notas cítricas, frutales, herbales, entre otras (Machado *et. al*, 2019; Bocquet *et al.*, 2018). Así, de acuerdo al porcentaje de α -ácidos, las variedades de lúpulo se pueden clasificar como lúpulos aromáticos, entre los que se encuentran las variedades Mapuche, Nahuel, Trafal y Cascade, y lúpulos amargos, que incluye a Nugget, Victoria, Patagonia Red, y Bullion, entre otras (Benedetto, s.f). Por otra parte, la síntesis de metabolitos no sólo difiere con la variedad, sino que también con las condiciones ambientales donde crecen las plantas, por lo que es posible hallar diferencias en el tipo y cantidad de metabolitos sintetizados, en una misma variedad cultivada en diferentes regiones.

1.2. Producción de lúpulo

1.2.1. Cultivo nacional e internacional

Actualmente, la producción de cerveza, principalmente artesanal, está orientada al *dry hopping* (agregado del lúpulo durante la fermentación con el fin de aportar aroma y sabor), y a la elaboración de cerveza “lupulada”. Entre los principales países productores de lúpulo se encuentran Alemania y Estados Unidos, alcanzando un total de entre el 70% y 80% de la producción mundial, la cual, actualmente, se estima en 129.000 toneladas anuales (Martínez Dodda, 2021; Rizzi y Tarazi, 2018; Machado *et al.*, 2019; Raiser, 2011). De las, 60 mil hectáreas son cultivadas alrededor del mundo, Argentina abarca una superficie de 189 hectáreas, centrada principalmente, en la Comarca Andina del Paralelo 42, donde se incluye una serie de localidades de las provincias de Río Negro y de Chubut, y en el Alto Valle del Río Negro (Figura 3). La producción nacional promedio es de 300 toneladas/año, de las cuales el 72% se destina a la industria, mientras que el 28% restante al sector *craft* o artesanal (Nievas *et al.*, 2021). Sin embargo, esta producción sólo cubre el 22% de la demanda del mercado nacional, representando el 0,2% de la producción mundial, lo que implica la importación de aproximadamente 665 toneladas anuales para satisfacer el consumo nacional (Martínez Dodda, 2021; Bocconi, 2020; Cámara de la Industria

Cervecera Argentina, 2020; Benedetto, s.f.). Asimismo, Nievas *et al.* (2021), afirman que si bien hasta la fecha el consumo de cerveza se encuentra en expansión, y que la tendencia mundial prevé un crecimiento anual del 4,5% durante el período 2020-2025, la superficie cultivada en el país no ha presentado un incremento significativo.

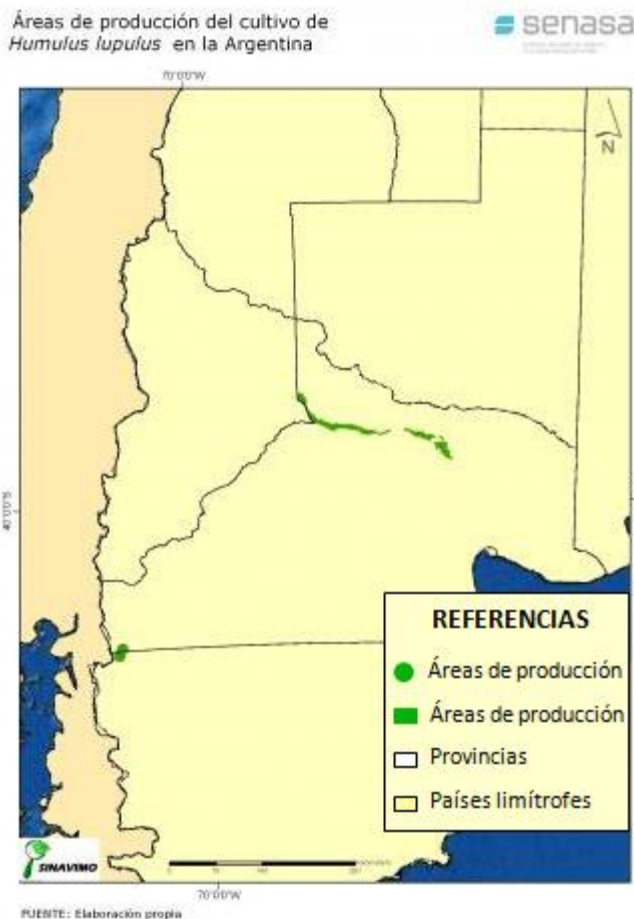


Figura 3. Zonas de producción de lúpulo en Argentina. Fuente: SINAVIMO (s.f.)

A fines del siglo XIX se realizaron los primeros cultivos en Argentina, en la ciudad de El Bolsón, y próximo a 1980 llegó al país la variedad Cascade, de origen estadounidense, de la cual se destaca su excelente adaptación, incluso superior a la de su país de origen. Además, Nugget, es otra de las variedades de lúpulo que presenta una buena respuesta en territorio nacional (Rizzi y Tarazi, 2018). Así, en el país existe una tendencia a cultivar variedades importadas de lúpulo con patentes caducadas o bien de libre uso, como las mencionadas con anterioridad. Pese a que estas variedades no son las más demandadas por los cerveceros, Cascade presenta un perfil similar a las nuevas variedades “estrella”, y Nugget es utilizada como variedad de amargor por su alto contenido de α -ácidos. No obstante, esta tendencia constituye una desventaja en términos de mercado al no ajustarse a la demanda de los

cerveceros, ya que a la hora de seleccionar variedades para la elaboración de los estilos de cerveza lupulados más consumidos (APA, IPA y NEIPA), la mayoría de los productores comerciales utilizan materia prima importada (conos y pellets). Dentro las variedades seleccionadas se encuentran Mosaic, Citra, Galaxy, Amarillo, Chinook, Centennial, Simcoe, entre otras, las cuales son desarrolladas y cultivadas por empresas en el exterior, y protegidas de forma tal que monopolizan el producto y ofrecen variedades exclusivas. Para estos estilos, de mayor demanda y consumo, son primordiales las características organolépticas de la variedad empleada, y esto no puede lograrse con los cultivos de nuestro país. Por dicho motivo, a pesar de su mayor costo y la necesidad de importarlas, estas nuevas variedades constituyen la opción predilecta, conocidas como las variedades “New World Hops” (“lúpulo del nuevo mundo”) producidas principalmente en Estados Unidos y Nueva Zelanda.

Por otra parte, en menor medida, se encuentra el cultivo de variedades nacionales como Trafal, Nahuel, Mapuche y Patagonia Red, utilizadas mayormente por los cerveceros artesanales debido a su bajo costo o por los cerveceros comerciales, principalmente por el aporte de amargor.

1.2.2. Cultivo en Viedma, Río Negro

En la ciudad de Viedma, que está ubicada dentro del rango de latitudes óptimo para el cultivo del lúpulo, éste fue introducido en 2018 por dos productores, en una superficie total aproximada de 1 hectárea, con una producción anual promedio de 30 kg (peso seco), destinada exclusivamente a la elaboración de cerveza artesanal local. Sin embargo, estos rendimientos están asociados a que las plantas son relativamente nuevas y que recién luego del cuarto o quinto año de cultivo alcanzarían su mayor productividad. Por otra parte, los conos femeninos son utilizados por los mismos productores y cerveceros locales debido a que carecen de una peletizadora que les permita acondicionarlos de forma tal que conserven la calidad en el tiempo y puedan ser transportados. El lúpulo fresco pierde su calidad de forma rápida por oxidación, y consecuentemente, su poder de amargor disminuye notablemente, por lo que el secado inmediato y el acondicionamiento (comprimido y embalado), o bien la elaboración de pellets o extracto de lúpulo, son los pasos post-cosecha sugeridos (SINAVIMO, s.f.).

Las variedades cultivadas en Viedma son Cascade, Bullion, Magnum, Victoria, Spalt y Nugget, dentro de las importadas, y, en menor medida, Mapuche, Nahuel y Trafal, de origen nacional (L. Pesado, comunicación personal, 30 de octubre de 2021; A. Leiza, comunicación personal, 30 de octubre de 2021). Las tres variedades nacionales tienen su origen en el Alto Valle de Río Negro, específicamente, en la chacra experimental de la empresa “Cervecería y Maltería Quilmes S.A”, localizada en la ciudad de Fernández Oro. Así, Mapuche y Trafal, desarrolladas en 1990, y Nahuel en 2018, surgieron, de

cruzamientos entre variedades conocidas y líneas propias de la empresa, en busca de mejores rendimientos y adaptación al clima regional. Actualmente, estas variedades nacionales, especialmente Mapuche, son utilizadas en algunas cervezas premium de América del Sur y Europa debido a sus características y perfiles aromáticos únicos. Por su parte, Mapuche se destaca por el alto contenido de aceite total, en comparación con las otras variedades argentinas, mientras que Nahuel se caracteriza por presentar el mayor rendimiento de las tres.

1.3. Métodos de propagación

1.3.1. Propagación tradicional y contrariedades

Al tratarse de una especie dioica, el lúpulo puede ser propagado a partir de sus semillas, no obstante, la demanda de la industria cervecera se concentra sólo en las plantas femeninas, lo cual excluye la posibilidad de propagación de los cultivos comerciales a través de esta vía reproductiva. Las plantas masculinas no son deseadas comercialmente, no sólo por la baja cantidad de resinas de sus inflorescencias, sino también porque las plantas femeninas podrían polinizarse y producir semillas en sus conos. Por estos motivos, tradicionalmente, el lúpulo se propaga de forma asexual a través de rizomas o por esquejes nodales, técnicas simples y económicas, que generalmente requieren fitorreguladores auxínicos para estimular la formación de raíces adventicias y mantener la dominancia de la yema apical (Agehara *et al.*, 2020; Faragó *et al.*, 2009). Sin embargo, estas formas de multiplicación, presentan ciertas desventajas relacionadas con el alto riesgo de contaminación, debido a que la propagación agámica, sostenida en el tiempo, favorece la dispersión y acumulación de infecciones virales y fúngicas, que pueden limitar la producción. Así, patógenos como el mildiú veloso, mildiú polvoso, virus del mosaico del manzano (ApMV), virus del mosaico del lúpulo (HpMV) y el virus latente del lúpulo (HpLV) se dispersan en todo el mundo a través de material contaminado, y generan grandes pérdidas económicas y de rendimiento, lo cual repercute en la industria cervecera (Agehara *et al.*, 2020; Eastwell y Barbara 2015a; Eastwell y Barbara 2015b; Gent, Johnson, *et al.*, 2015; Gent, Nelson, *et al.*, 2015; Echenique *et al.*, 2004). En este contexto, las técnicas biotecnológicas como la micropropagación contribuyen positiva y significativamente en los programas de multiplicación a gran escala de material vegetal, de óptima calidad sanitaria. En este sentido, Agehara *et al.* (2020) reportan que, desde la utilización de plantas de lúpulo propagadas *in vitro*, no se han producido graves problemas por enfermedades en un campo experimental.

1.3.2. Micropropagación y su aplicación en lúpulo

La micropropagación incluye un conjunto de técnicas y métodos de cultivo de tejidos vegetales (CTV) que, permiten obtener una gran cantidad de plantas exactamente iguales (clones) a la planta madre, en un corto período de tiempo y en espacios reducidos (Sharry *et al.*, 2015; Faragó *et al.*, 2009). El CTV comprende una serie de biotécnicas que posibilitan el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de cualquier parte de una planta, desde una célula hasta un organismo completo, bajo condiciones controladas y axénicas de laboratorio. En términos generales, este tipo de cultivo *in vitro* incluye la regeneración de plantas a partir de explantes (es decir, cualquier parte del vegetal que, separado de la planta madre, permite iniciar el cultivo) con diferentes técnicas de cultivo de tejidos, órganos o células vegetales. Éstas se basan en la totipotencialidad celular que permite obtener una planta completa a partir de cualquier célula viva, bajo condiciones controladas de cultivo (Haberlandt, 1902).

El establecimiento del CTV consta de pasos generales, que incluyen la elección y acondicionamiento de las plantas madres y de los explantes a utilizar, seguido de una etapa de multiplicación y posterior aclimatación; no obstante, esto dependerá del objetivo del mismo y del material vegetal inicial. Sin embargo, como punto de partida para establecer una metodología eficiente de propagación *in vitro*, resulta necesario contar con un protocolo de desinfección adecuado a cada tipo de explante y de variedad, así como también conocer la respuesta de éstos frente a las condiciones propias del cultivo de tejidos. Así, dependiendo del tipo de explante, el medio nutritivo y las condiciones de incubación (luz y temperatura), diversas respuestas morfogénicas (cambios estructurales) se pueden producir al llevar a cabo el CTV, entre las que se encuentran la organogénesis y la embriogénesis somática (Villarreal, 2015; Mroginski y Roca, 1991). La organogénesis consiste en el desarrollo de órganos, como brotes y/o raíces, de *novo* en los tejidos vegetales establecidos *in vitro* (Trigiano y Gray, 2016; Torrey, 1966). Estas nuevas partes formadas, que normalmente no se producirían, son denominadas adventicias. La organogénesis puede ser directa o indirecta (Villarreal, 2015; Olmos *et al.*, 2004):

- Organogénesis directa: la formación de los nuevos brotes o raíces proviene de yemas axilares, apicales o laterales. Esto ocurre generalmente cuando el material de partida es tejido meristemático; sin embargo, al cultivar otro tipo de tejidos en medios nutritivos con citocininas, también es posible esta vía de regeneración.
- Organogénesis indirecta: el desarrollo de los nuevos órganos se origina en un callo, el cual se caracteriza por ser una masa de células no diferenciadas derivada del explante. Su aptitud

morfogénica está relacionada con el balance de los reguladores de crecimiento (Woodward, 1997). Generalmente, el tejido de partida utilizado, es parenquimático.

Por su parte, la embriogénesis somática es un proceso asexual, similar a la embriogénesis cigótica, que se refiere a la capacidad de ciertas células somáticas de formar embriones que pueden desarrollar una planta completa, genéticamente idéntica a la célula de origen, luego del proceso de germinación (Villarreal, 2015; Radice, 2004; Tokin, 1964). Al igual que la organogénesis, esta vía de regeneración puede producirse de manera directa o indirecta (Villarreal, 2015; Olmos *et al.*, 2004):

- Embriogénesis somática directa: los embriones se desarrollan directamente sobre el explante inicial.
- Embriogénesis somática indirecta: la formación de los embriones se origina en un callo (Perez Molphe *et al.*, 1999).

La respuesta morfogénica deseada puede obtenerse al cultivar los explantes estériles en medios nutritivos suplementados con diversos reguladores de crecimiento (PGR), entre los que se encuentran las auxinas, las citocininas, las giberelinas, el ácido abscísico y el etileno. En este sentido, Skoog y Miller (1957) exponen que el balance entre auxinas y citocininas regula todo proceso de diferenciación, y sugieren que cuando la relación auxina/citocinina es alta ($A/C > 1$) se formarán raíces, cuando prevalecen citocininas ($A/C < 1$) se espera el desarrollo de vástagos, y, con relaciones cercanas a 1 ($A/C \cong 1$) se obtendrán callos (Villarreal, 2015; Segura, 2008; Krikorian, 1995). Por otra parte, cabe destacar que el CTV también puede ser utilizado para generar variabilidad genética a través de la vía de regeneración indirecta. De esta forma, es posible conservar y propagar la diversidad genética ya que se pueden generar variantes somaclonales, lo cual implica la regeneración de plantas con mutaciones heredables a sus progenies, a partir de células desdiferenciadas obtenidas del cultivo de callos, de células o de protoplastos (Tabares *et al.*, 1991).

La propagación *in vitro* de lúpulo es factible y resulta un aspecto clave al tratarse de un cultivo que se propaga casi exclusivamente a través de sus rizomas. En este sentido, si bien las secciones nodales han sido el material vegetal preferentemente utilizado, también se han introducido otros tipos de explantes como brotes adventicios, pecíolos, secciones internodales e incluso meristemas, para su regeneración (Liberatore *et al.*, 2020; Horlemann *et al.*, 2003; Roy *et al.*, 2001; Gurriarán *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 1999; Adams, 1975). Estas investigaciones, descritas en el Anexo 1, han permitido evaluar diversas vías de regeneración del lúpulo con el fin de inducir organogénesis o embriogénesis somática, con la

aplicación de diferentes reguladores de crecimiento (Bocquet *et al.*, 2018). Asimismo, se proponen múltiples opciones para la desinfección del material vegetal donde, en términos generales, se considera un lavado previo, normalmente con detergente, una posterior inmersión en una solución de etanol 70%, y luego en hipoclorito de sodio (NaClO) a diversas concentraciones por tiempos variables, bajo campana de flujo laminar (Roca y Mroginsky, 1991). Ocasionalmente, se considera la adición de antibióticos al medio de cultivo, pero debido a que ello puede modificar la composición del medio, sólo se utiliza en cultivos de corta duración (Roca y Mroginsky, 1991). Además, se suelen sugerir tratamientos con soluciones fungicidas y bactericidas por un tiempo que varía entre 15 y 60 minutos, generalmente, previo a la aplicación de etanol e hipoclorito de sodio (Jara y Seemann, 2007). En este sentido, es preciso señalar que las investigaciones realizadas hasta el momento, se han llevado a cabo con diversas variedades de lúpulo, no obstante, el comportamiento *in vitro* de las variedades nacionales Mapuche, Nahuel y Trafal, aún no ha sido explorado, a pesar de que ello representa para los productores de Viedma la posibilidad de obtener nuevos productos con identidad local.

En los últimos años, dentro de los métodos de propagación *in vitro*, el cultivo de meristemas se ha convertido en la técnica base para la multiplicación por vía organogénesis, lo que conlleva a su amplia utilización en el campo de la biotecnología vegetal (Acarapi, 2014). Ésta permite obtener plántulas completas, y posteriormente inducir la formación de brotes axilares, conservar germoplasma a bajas temperaturas (criopreservación), preservar las características genéticas de la planta madre, y eliminar patógenos de los cultivos, principalmente virus (Faragó *et al.*, 2009; Echenique *et al.*, 2004). Los meristemas son un conjunto de células indiferenciadas capaces de generar una planta de *novo*, que carecen de tejido vascular, lo cual impide que los virus se transporten hasta allí como lo hacen hacia el resto de la planta, a través de los tejidos de conducción. Asimismo, la probabilidad de que los meristemas apicales se encuentren infectados es relativamente baja en comparación con tejidos más diferenciados, ya que la distribución de microorganismos patógenos en los tejidos de la planta infectada no es uniforme, y su concentración tiende a disminuir progresivamente hacia el ápice del tallo (Espinoza, 2013). Otra de las razones por las cuales los meristemas se encuentran libres de patógenos es su alta actividad metabólica, debido a la activa mitosis, y altas concentraciones de auxinas que inhiben la multiplicación de los virus (Echenique *et al.*, 2004). Para el cultivo de este tipo de tejido se debe realizar la extracción del domo meristemático y su siembra en un medio nutritivo adecuado, adicionado con reguladores de crecimiento apropiados para inducir el desarrollo de una planta completa. Generalmente,

el domo meristemático se aísla acompañado de uno o dos primordios foliares, ya que éstos participan de su desarrollo (Echenique *et al.*, 2004) (Figura 4).

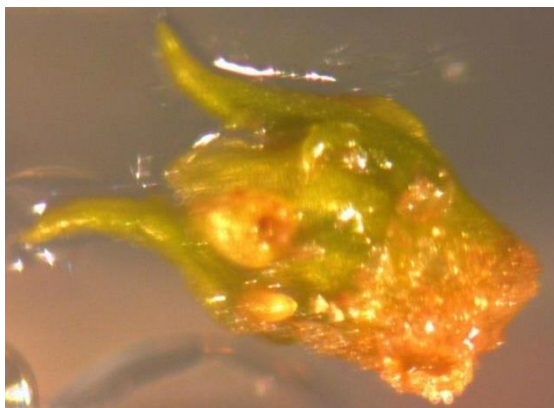


Figura 4. Meristema axilar de lúpulo (*Humulus lupulus*). Imagen tomada con cámara Leica ®

1.4. Semillas sintéticas

Una de las finalidades que puede tener el cultivo *in vitro* es la obtención de semillas sintéticas, debido al alto valor del material vegetal con el que se está trabajando o su interés por conservarlo. Inicialmente, la técnica de encapsulación comprendía exclusivamente el recubrimiento de embriones somáticos con una cubierta gelatinosa como, por ejemplo, de alginato de sodio, para la producción de semillas sintéticas; sin embargo, la encapsulación de brotes apicales o axilares, segmentos de raíces, entre otros, derivados del cultivo *in vitro*, y capaces de convertirse en una plántula completa, se han empleado en los últimos años, como una alternativa al uso de embriones somáticos (Adriani *et al.*, 2000; Standardi y Piccioni 1998; Sarkar y Naik 1997). Estas semillas sintéticas no embriogénicas pueden ser utilizadas para la propagación de aquellas plantas en las que la embriogénesis somática no está bien establecida (Khan *et al.*, 2018). En este sentido, la tecnología de la semilla sintética se define como el revestimiento de cualquier material vegetal meristemático, ya sea embriones somáticos, meristemas, brotes o microestacas (Navarro Ureña, 2002).

En aspectos generales, esta técnica simula las partes de una semilla biológica de forma tal que el material vegetal encapsulado pueda crecer y convertirse en una planta completa. Los propágulos (embriones, brotes, yemas, meristemas, entre otros) son encapsulados en gotas de alginato de sodio, por lo general al 2%, que pueden ser suplementadas con alguna solución específica, de acuerdo a las necesidades, por ejemplo, soluciones antioxidantes, medios nutritivos, entre otras (Sharma *et al.*, 2013). Esta matriz que recubre el explante, actúa como un endosperma sintético y protege los micropropágulos,

además de conferir resistencia a la desecación y proporcionar la presión mecánica necesaria para retenerlo dentro de la cápsula, durante el almacenamiento, lo cual posibilita la conservación y el intercambio de germoplasma (Alatar y Faisal, 2012; West *et al.*, 2006; Navarro Ureña, 2002; Antonietta *et al.*, 1999; Nieves *et al.*, 1998; Hasan y Takagi 1995). Asimismo, esta técnica asegura la uniformidad genética del material vegetal y la conservación de las condiciones sanitarias de la planta, permite un intercambio fácil de material estéril entre laboratorios, transportabilidad y almacenamiento, y presenta la potencialidad de mecanización (Standardi y Micheli, 2013; Gray *et al.*, 1995; Redenbaugh, 1993). En términos de conservación, se deben tener en cuenta diversas variables tales como la luz, la temperatura y las condiciones de almacenamiento, para una aplicación exitosa de las semillas sintéticas (Ray y Bhattacharya, 2008). Por lo general, se utilizan temperaturas próximas a los 4°C para cultivos de clima templado, y entre 10 y 15°C cuando se trata de germoplasma tropical (Keller *et al.*, 2006).

A pesar de las ventajas que representa la encapsulación de micropropágulos no embriogénicos para el almacenamiento e intercambio de germoplasma, se ha explorado sólo en unas pocas especies de plantas (Soneji *et al.* 2002; Pattnaik y Chand 2000; Hasan y Takagi 1995; Sharma *et al.* 1994). En este contexto, la utilización de semillas sintéticas en distintos cultivares de lúpulo permitiría su conservación a mediano y largo plazo, en condiciones de buena estabilidad genética y fisiológica, y a su vez, facilitaría el transporte del material entre productores.

2. HIPÓTESIS

2.1. Hipótesis general

El cultivo de tejidos *in vitro* constituye una alternativa para la propagación de variedades de lúpulo (*Humulus lupulus*) de origen nacional.

2.2. Hipótesis específicas

- Es posible desarrollar un protocolo de desinfección que permita introducir al CTV diferentes tipos de explantes y variedades nacionales de lúpulo.
- La aplicación de diferentes reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, es capaz de inducir diferentes respuestas.
- Debido a que la respuesta al CTV es genotipo dependiente, ésta presentará diferencias entre las variedades de lúpulo y el tipo de explante evaluado.

- La introducción al CTV de *Humulus lupulus* var. *mapuche*, var. *nahuel* y var. *traful*, representa el primer avance en el conocimiento sobre la propagación y conservación, *in vitro* y *ex situ*, de estas variedades nacionales.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

La tendencia actual de utilizar exclusivamente un sistema de propagación agámica a través de rizomas para el cultivo de lúpulo, representa una desventaja para los productores locales en términos de calidad del material y de costos de producción. Por otra parte, en la actualidad, el cultivo de las variedades nacionales no sólo ha quedado relegado, sino que, junto con las variedades importadas no se ajustan a las demandas y necesidades del mercado. En este contexto, el presente proyecto tiene como objetivo evaluar las respuestas al cultivo de tejidos *in vitro* de las variedades nacionales de lúpulo (*Humulus lupulus*), Mapuche, Nahuel y Traful, con el fin de proporcionar las primeras bases del conocimiento sobre la propagación de éstas a través de la biotecnología vegetal, en vista de satisfacer las demandas actuales.

3.2. Objetivos específicos

- Lograr un protocolo adecuado para la desinfección de diferentes tipos de explantes y variedades nacionales de lúpulo
- Seleccionar el mejor tipo de explante en las tres variedades evaluadas
- Inducir las respuestas organogénicas en diferentes tipos de explantes y variedades
- Evaluar las respuestas obtenidas al cultivo *in vitro* en cada caso
- Seleccionar la variedad nacional de *H. lupulus* con mejor respuesta al cultivo de tejidos vegetales.
- Establecer las primeras bases de conocimiento necesarias para lograr un protocolo de propagación *in vitro* para las variedades nacionales de lúpulo (Mapuche, Nahuel y Traful).

4. METODOLOGÍA

4.1. Lugar de trabajo y sitios de muestreo

Los diversos ensayos fueron realizados en el laboratorio de biotecnología vegetal de la Universidad Nacional de Río Negro, Sede Atlántica, radicada en la ciudad de Viedma, Río Negro.

El muestreo se realizó en dos chacras locales productoras de lúpulo. Una de ellas se localiza en el centro IDEVI donde se emplaza la empresa “Zopilote de la Patagonia”, y la otra se ubica a costa del río Negro, las cuales comercializan lúpulo bajo el nombre de “Lúpulo Bieder” y “Lúpulos del Atlántico”, respectivamente (Figura 5).

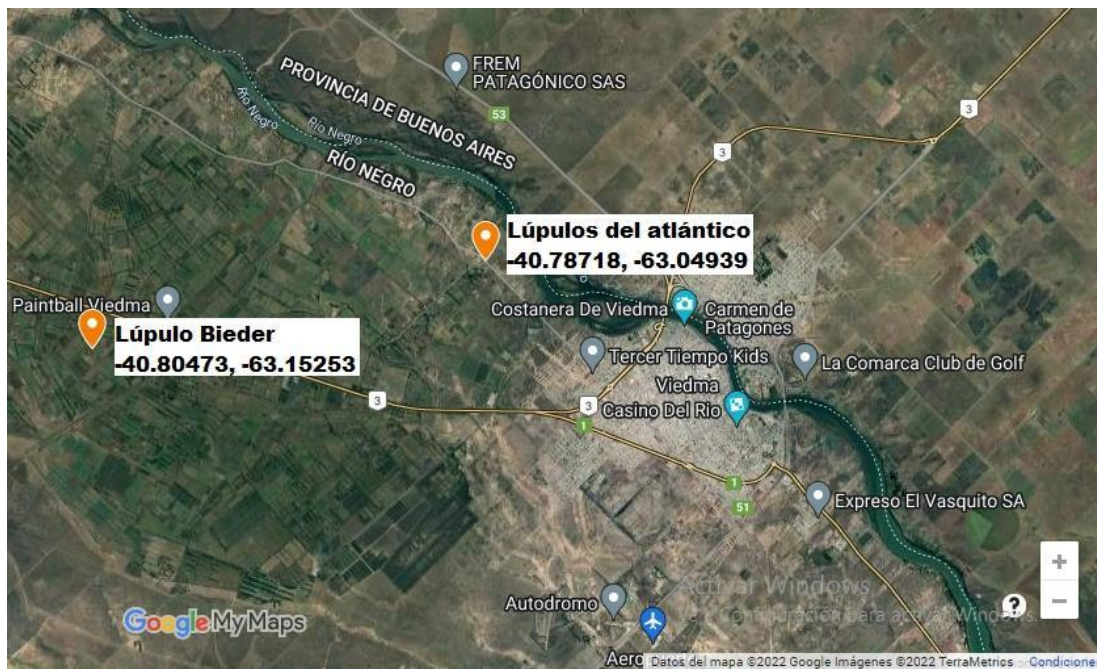


Figura 5. Localización de los sitios de muestreo

4.2. Selección de las plantas madres

En esta etapa fueron seleccionadas las plantas madres de diferentes variedades con buen porte, de aspecto vigoroso y óptimo estado sanitario (libre de patógenos, deficiencias o estrés), a partir de las cuales se inició la micropropagación. Así, se escogieron las variedades comerciales de lúpulo (*Humulus lupulus*) de origen nacional: Mapuche, Nahuel y Trafal. La colecta del material vegetal se realizó durante el período vegetativo de las plantas (de octubre a febrero). Sin embargo, en este sitio de muestreo para una misma fecha de colecta, la variedad Mapuche presentó un desarrollo vegetativo menor que las otras variedades. Las muestras se tomaron al azar, de diversas plantas madre, con un N mínimo de 5 (en función de la disponibilidad), de las tres variedades.

El corte de los brotes se hizo manualmente, en bisel, con una tijera de podar previamente desinfectada con etanol 70% (v/v). La longitud de los brotes estuvo sujeta al desarrollo vegetativo de cada planta madre en el momento de colecta, y se seleccionaron aquellos que contenían al menos cuatro nudos.

Las muestras se colocaron sobre papel tissue húmedo y se transportaron en bolsas con cierre hermético en una heladera portátil, a fin de evitar la deshidratación durante el traslado. Finalmente, éstas fueron almacenadas a 4°C, hasta el momento del inicio de los ensayos (máximo 15 días).

4.3. Inicio del cultivo de tejidos *in vitro*

4.3.1. Desinfección del material vegetal

Una vez recolectado el material vegetal, éste se acondicionó y desinfectó superficialmente con el fin de evitar el desarrollo de microorganismos, principalmente bacterias y hongos, que puedan competir ventajosamente con el explante durante el cultivo *in vitro*. En este sentido, en una primera instancia, los brotes extraídos de las plantas madres se cortaron en secciones uninodales de aproximadamente 5 cm. de longitud, a las que se les removieron las hojas. Luego, se establecieron dos protocolos de desinfección, uno para el aislamiento de los meristemas y otro para la obtención de secciones uninodales (microestacas). Asimismo, dada la dificultad para erradicar la contaminación de las microestacas provenientes de campo, se realizó una serie de ensayos preliminares que permitieron guiar los futuros protocolos de desinfección de los tejidos hacia el método que resultara más eficiente.

4.3.1.1. Desinfección para el aislamiento de meristemas

Previo al aislamiento de los meristemas, bajo campana de flujo laminar, el material vegetal se sumergió, primeramente, en una solución de etanol 70% v/v durante 5 minutos, con agitación constante, utilizando un agitador magnético. Luego, se retiró el etanol, y el material se sometió a una solución de hipoclorito de sodio comercial (35 gCl/l) al 10% v/v, con Tween 20®, por un periodo de 20 minutos, nuevamente, en agitación constante. Finalmente, se realizaron tres lavados consecutivos con agua destilada estéril. Se desinfectaron un total de 110 secciones uninodales de cada variedad de lúpulo, con el fin de obtener aproximadamente un N= 210 meristemas de cada una de ellas, considerando posibles pérdidas por deshidratación y/u oxidación durante el proceso de aislamiento y desinfección.

4.3.1.2. Desinfección para el aislamiento de microestacas

A) Ensayos preliminares

Dado que el tallo de lúpulo presenta pelos retrorsos, para este tipo de explante en particular, se realizaron ensayos preliminares de desinfección (Tabla 1). Así, se evaluaron diversos tiempos de inmersión y concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO), la inclusión de una solución fungicida y la concentración a utilizar, y la incorporación de pretratamientos del material vegetal (lavados con agua

y/o jabón blanco). En cada uno de los ensayos preliminares realizados, la concentración de hipoclorito de sodio y de fungicida aumentó progresivamente, a fin de evaluar y seleccionar el protocolo más eficiente para controlar la contaminación, y que, a su vez, no produjera daños en los tejidos vegetales.

Tabla 1. Ensayos preliminares para la desinfección de microestacas

Número de ensayo	N (por variedad)	Acondicionamiento	Protocolo
1	10	Corte en secciones uninodales de 5 cm y remoción de hojas	1) 45 min. Carbendazim (50g) 0,005 ul/ml. 2) 5 min. etanol 70% v/v. 3) 20 min. NaClO (60 gCl/l) 7% v/v + 2 gotas de Tween 20®. 4) Enjuague con agua destilada estéril.
2	20	Corte en secciones uninodales de 5 cm y remoción de hojas	1) Lavado de las secciones con cepillo y jabón blanco. 2) 45 min. Carbendazim (50g) 5 ul/ml. 3) 5 min. etanol 70% v/v. 4) 10 min. NaClO (25 gCl/l) 15% v/v + 2 gotas de Tween 20®. 5) Enjuague con agua destilada estéril.
3	25	Corte en secciones con, al menos, 3 nudos y remoción de hojas	1) 30 min. de enjuague en agua corriente 2) 1 hora Carbendazim (50g) 5 ul/ml. 3) 5 min. etanol 70% v/v. 4) 15 min. NaClO (25 gCl/l) 10% v/v + 2 gotas de Tween 20®. 5) Enjuague con agua destilada estéril.
4	10	Corte en secciones uninodales de 5 cm y remoción de hojas	1) 30 min. de enjuague en agua corriente 2) 1 hora Carbendazim (50g) 5 ul/ml. 3) 5 min. etanol 70% v/v. 4) 15 min. NaClO (35 gCl/l) 10% v/v + 2 gotas de Tween 20®. 5) Enjuague con agua destilada estéril.
5	10	Corte en secciones uninodales de 5 cm y remoción de hojas	1) 30 min. de enjuague en agua corriente 2) 1 hora Carbendazim (50g) 5 ul/ml. 3) 5 min. etanol 70% v/v. 4) 15 min. NaClO (35 gCl/l) 15% v/v + 2 gotas de Tween 20®. 5) Enjuague con agua destilada estéril.

B) Protocolos finales

Luego de las respuestas obtenidas de los ensayos preliminares, se llevaron a cabo dos tratamientos, en adelante, T1 y T2. Ambos comenzaron con una desinfección preliminar que consistió en someter las microestacas de 5 cm. de longitud a una solución de agua y jabón por 30 minutos, y luego a una solución fungicida (Carbendazim 50g) 5µl/ml, durante 1 hora, para T1 y 24 horas para T2, con agitación constante. Seguido a ello, bajo campana de flujo laminar, los explantes se sumergieron por 5 minutos en una solución de etanol (70% v/v), y luego durante 15 minutos en hipoclorito de sodio comercial (35 gCl/l, 15% v/v) al que se adicionó Tween 20®. Para concluir, se realizaron tres lavados consecutivos con agua destilada estéril. En ambos tratamientos se realizaron tres repeticiones de n=25 cada una, obteniendo así un N=150 para cada variedad.

4.3.2. Selección y acondicionamiento de los explantes

Con la finalidad de contar, por un lado, con una vía regenerativa que asegure la calidad fitosanitaria y por otro, con una metodología de mayor simplicidad, como es el microestaquillado, se seleccionaron dos tipos de explantes:

- Meristemas
- Secciones uninodales o microestacas

Para preservar las condiciones asépticas necesarias, se trabajó bajo campana de flujo laminar donde se extrajeron los explantes a partir del material vegetal previamente desinfectado.

El aislamiento de meristemas se realizó bajo una lupa binocular, con la ayuda de un bisturí y agujas inyectables, previamente desinfectadas mediante un flameado en mechero, y rociadas constantemente con etanol (70% v/v). A los mismos se les dejó al menos dos primordios foliares a fin de evitar problemas de deshidratación u oxidación de los explantes.

Por otra parte, para la obtención de las secciones uninodales se seleccionó material vegetal de $0,4 \pm 0,1$ cm. de diámetro, el cual fue seccionado en segmentos de aproximadamente 2 cm de longitud. Luego, se removieron las brácteas que protegen las yemas axilares y se les realizó un corte en la parte inferior, en forma de bisel. Por último, previo a la introducción de las secciones en los medios de cultivos correspondientes, se procedió a quitar el exceso de agua proveniente de los enjuagues de la desinfección, apoyando rápidamente los explantes sobre papel tissue estéril.

4.3.3. Caracterización morfológica del material vegetal

Con el objetivo de conocer la morfología de los tallos y determinar el tipo y la cantidad de tricomas presentes en él, se realizó una observación bajo lupa binocular provista de cámara fotográfica Leica®, de cada una de las variedades seleccionadas. Para ello, los tallos se cortaron de 1 cm. de longitud y se contabilizaron los tricomas presentes. Asimismo, se hizo un corte transversal para observar la disposición de los mismos y la forma del tallo.

4.4. Inducción de respuestas morfogénicas

Luego de la desinfección superficial y posterior acondicionamiento de los explantes, éstos se cultivaron en medio nutritivo estéril, adicionado con diferentes reguladores de crecimiento (auxinas, citocininas y giberelinas) de acuerdo a los antecedentes de micropropagación publicados para esta especie y a la respuesta morfogénica deseada (Tabla 2). En todos los casos, se utilizó como medio de cultivo basal el de Murashige y Skoog (MS) semisólido (Murashige y Skoog, 1962).

Para inducir la formación de brotes múltiples, el medio MS fue suplementado con citocininas (MIB), y para la elongación de entrenudos se utilizó AG₃ (ME), mientras que para promover la rizogénesis, se adicionaron reguladores de tipo auxínicos.

En todos los casos, se realizaron los respectivos controles, los cuales consistieron en el cultivo de los explantes en medios nutritivos sin la adición de reguladores de crecimiento. Se inició así el cultivo *in vitro* de los diferentes explantes de las variedades seleccionadas.

En general, los cultivos se mantuvieron en condiciones controladas de luz (fotoperíodo de 16hs luz/8hs oscuridad, utilizando un tubo fluorescente con una intensidad de 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ seg (PPFD) y a una temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), de acuerdo con los requerimientos térmicos informados como óptimos para esta especie (Nievas *et al.*, 2021), a excepción de aquellos que fueron sometidos a otras condiciones experimentales de luz y temperatura, de acuerdo a las particularidades de cada ensayo.

Tabla 2. Medios de cultivo

Uso	Denominación del medio	Reguladores de crecimiento (PGR)	Otros
CONTROL	½ MS	-	½ MS ⁽¹⁾ Sacarosa (30 /l) Agar (6 g/l) ⁽⁸⁾ pH 5,8 - 6,2
M E R I S T E M A S	MIB (medio de inducción de brotes)	BAP ⁽²⁾ (0,88 µM)	½ MS ⁽¹⁾ Sacarosa (30 /l) Agar (6 g/l) ⁽⁸⁾ pH 5,8 - 6,2
	ME (medio de elongación)	AG ₃ ⁽³⁾ (2,89 µM)	½ MS ⁽¹⁾ Sacarosa (30 /l) Agar (6 g/l) ⁽⁸⁾ pH 5,8 - 6,2
	½ MS BAP: IBA	BAP ⁽²⁾ (0,88 µM) e IBA ⁽⁴⁾ (2,46 µM)	½ MS ⁽¹⁾ Sacarosa (30 /l) Agar (6 g/l) ⁽⁸⁾ pH 5,8 - 6,2
	½ MS IBA: 2,4-D	IBA ⁽⁴⁾ (9,84 µM y 2,4-D (0,45 µM)	½ MS ⁽¹⁾ Sacarosa (30 /l) Agar (6 g/l) ⁽⁸⁾ pH 5,8 - 6,2
ENRAIZAMIENTO MICROESTACAS	½ MS IBA: AIA	IBA ⁽⁴⁾ (5,7 µM) y AIA ⁽⁵⁾ (4,9 µM)	½ MS ⁽¹⁾ Sacarosa (30 /l) Agar (6 g/l) ⁽⁸⁾ pH 5,8 - 6,2
SEMILLAS SINTÉTICAS	½ MS BAP:AG ₃	BAP ⁽²⁾ (0,88 µM y AG ₃ ⁽³⁾ (2,89 µM)	½ MS ⁽¹⁾ Sacarosa (30 /l) Agar (6 g/l) ⁽⁸⁾ pH 5,8 - 6,2

RUSTICACIÓN	½ MS Sac. 20	-	½ MS ⁽¹⁾ Sacarosa (20 /l) Agar (6 g/l) ⁽⁸⁾ pH 5,8 - 6,2
	¼ MS Sac. 20	-	¼ MS ⁽⁷⁾ Sacarosa (20 /l) Agar (6 g/l) ⁽⁸⁾ pH 5,8 - 6,2
<p>(1) ½ MS: Murashige y Skoog (1962) a la mitad de la concentración original (Phyto Technology Laboratories ®) (2) Stock de BAP (6-Bencilaminopurina) Sigma-Aldrich®: 2 g/l (3) Stock AG₃ (ácido giberélico) Sigma-Aldrich®: 2 g/l (4) Stock IBA (ácido indol-butírico) Sigma-Aldrich®: 0,025 M (5) Stock AIA (ácido indolacético) Sigma-Aldrich®: 0,025 M (6) Stock 2,4 – D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) Sigma-Aldrich®: 10 mg/ml (7) ¼ MS: Murashige y Skoog (1962) a un cuarto de la concentración original (Phyto Technology Laboratories ®) (8) Agar: agar-agar (Britania®)</p>			

4.4.1. Meristemas

4.4.1.1. Inducción de brotes múltiples

Para la inducción de brotes múltiples de los explantes meristemáticos, se realizaron tres repeticiones de n=15, tanto en el ensayo como en el control, de forma tal que se trabajó con un N=90 de meristemas para cada variedad de lúpulo. Los explantes fueron introducidos en tubos de cultivo provistos de MIB (medio de inducción de brotes), el cual contenía BAP, de acuerdo a la metodología propuesta por Adams (1975). Cabe destacar que este PGR está asociado a la inducción de brotes múltiples (Skoog y Miller, 1957). Los meristemas utilizados como control fueron cultivados en el ½ MS (sección 4.4).

Los explantes se mantuvieron en un cuarto de cultivo con un fotoperíodo de 16hs luz/8hs oscuridad, utilizando un tubo fluorescente con una intensidad de 50 µmol/m² seg, a una temperatura de 21 ± 2°C. Finalizado el ensayo, se evaluaron las siguientes respuestas organogénicas: presencia de nuevos brotes y/o elongación de los mismos, aparición de callo y formación de raíces.

4.4.1.2. Elongación de entrenudos

Luego de un mes de incubación en MIB, los meristemas fueron transferidos al medio de elongación (ME) (Tabla 2), el cual contenía Ácido giberélico (AG₃ 2,89 µM), de acuerdo a lo sugerido por Adams,

(1975). Los cultivos se mantuvieron en condiciones de luz (fotoperiodo) y temperaturas descritas anteriormente (sección 4.4).

Luego de 2 meses de iniciado el ensayo, se evaluó la elongación de entrenudos, la altura de los mismos, la aparición de callo y la formación de raíces.

4.4.1.3. Enraizamiento de brotes

Es importante destacar que algunos brotes pueden enraizar en el mismo medio de cultivo donde los meristemas se diferencian, por lo que no es necesario que éstos atraviesen la etapa de enraizamiento. Así, el número de explantes que llegaron a esta instancia se redujo y ello repercutió en los diversos n utilizados para cada variedad en este ensayo.

Luego de dos meses del cultivo en medio de elongación de entrenudos (ME), aquellos brotes que sólo contaban con una raíz o carecían de las mismas (Tabla 3), fueron cultivados en medios nutritivos suplementados con auxinas con el fin de inducir el enraizamiento. El ensayo se llevó a cabo en dos etapas de acuerdo a lo establecido por Adams, (1975): en primer lugar, los explantes fueron cultivados en ½ MS BAP:IBA, y se mantuvieron en condiciones de fotoperiodo y temperatura descritas anteriormente (sección 4.4). Luego de 30 días, se cultivaron en ½ MS IBA:2,4-D (Tabla 4). Aquí, los primeros 15 días se mantuvieron las mismas condiciones de incubación de la primera etapa, y posteriormente, se disminuyó la intensidad lumínica que recibía el explante (semioscuridad), de acuerdo a lo establecido por Monteouis y Bon (2000).

Los controles se realizaron a los 15 y 30 días, y se evaluó la formación de raíces, la vía de regeneración (organogénesis directa o indirecta), y la presencia de callos.

Tabla 3. N de brotes en primera etapa de enraizamiento

Variedad	N
Traful	30
Nahuel	34
Mapuche	17

Tabla 4. N de brotes en segunda etapa de enraizamiento

Variedad	N
Traful	30
Nahuel	31
Mapuche	17

4.4.2. Microestacas procedentes del cultivo *in vitro*

4.4.2.1. Enraizamiento de microestacas

Las plántulas obtenidas de los ensayos preliminares de desinfección, y aquellas provenientes del cultivo de meristemas, fueron utilizadas como material de partida para obtener nuevas secciones uninodales y, de esta manera, evaluar el enraizamiento de las mismas en ½ MS IBA:AIA, según lo reportado por Roy *et al.* (2001). Dada la disponibilidad de material, se realizó una repetición de este tratamiento con N=10, para cada variedad estudiada, y una de N=5 para los controles (sin la adición de auxinas). Los ensayos se incubaron en las condiciones de luz/oscuridad y temperatura antes indicadas (sección 4.4). En esta instancia, se evaluó la presencia de callo, la formación de raíces, y la vía de regeneración (organogénesis directa o indirecta).

4.5. Aclimatación y rusticación de vitroplantas

Las plantas completas de lúpulo obtenidas de los ensayos preliminares de desinfección de microestacas y del cultivo de meristemas (Tabla 5), estuvieron en condiciones de iniciar el proceso de aclimatación y rusticación. En este sentido, de acuerdo a lo propuesto por Ziv (1995) y Olmos *et al.* (2004), en primera instancia, las vitroplantas fueron transferidas a un medio donde se redujo la concentración de sacarosa a 20 g/l (½ MS Sac.20), a fin de promover la rizogénesis. Luego, transcurridos 45 días, éstas fueron repicadas en un medio de cultivo en el cual se redujo la concentración de nutrientes (¼ MS Sac.20).

Finalmente, las plantas completas se transfirieron a sustrato (Growmix®), compuesto por compost de corteza, dolomita y perlita, para realizar el proceso de rusticación.

Los cultivos se mantuvieron en condiciones de luz y temperatura controladas (fotoperiodo, 21 ± 2°C). Se realizaron controles cada 20 días donde se evaluó el estado fisiológico de las plantas y la supervivencia.

Tabla 5. N de *in vitro* plantas obtenidas

Explante de partida	Variedad	N
Meristema	Traful	5
	Nahuel	2
	Mapuche	3
Microestaca	Mapuche	4

4.6. Obtención de semillas sintéticas

A fin de evaluar la posibilidad de conservación a corto plazo de los explantes meristemáticos encapsulados (semillas sintéticas), se realizaron diversos tratamientos con tres repeticiones de n=10 cada uno, es decir, un N=120 para cada variedad de lúpulo (Tabla 6). Bajo la campana de flujo laminar, estos explantes fueron sumergidos en una matriz de alginato de sodio al 2% (p/v) previamente esterilizada y recogidos con una micropipeta en pequeñas gotas, que posteriormente se dispusieron en una solución de cloruro de calcio (100 mM), en agitación constante, con un tiempo de inmersión de entre 3 a 5 minutos. Finalmente, las cápsulas se colocaron sobre papel tissue estéril a fin de remover el exceso de CaCl₂.

Las semillas sintéticas (SS) fueron cultivadas, en una primera instancia, en ½ MS, y luego de una, dos y tres semanas de almacenamiento en frío a 4°C y oscuridad, se transfirieron a ½ MS BAP:AG₃. Finalmente, se incubaron en condiciones de luz y temperatura controladas (fotoperiodo de 16 hs luz / 8hs oscuridad, y 21 ± 2°C). Asimismo, se realizó un control en oscuridad completa, a 21 ± 2°C, y uno bajo las condiciones de luz y temperatura detalladas anteriormente, por lo que estos explantes no fueron incubados en frío. En este caso, las semillas sintéticas fueron cultivadas en ½ MS BAP:AG₃.

Luego de 7, 14 y 21 días, se evaluaron los siguientes aspectos: oxidación de los explantes, formación de raíces, y porcentaje de semillas sintéticas que se convirtieron, es decir, en las cuales se produjo la ruptura de la matriz de encapsulamiento por la aparición de brotes (Ray y Bhattacharya, 2008).

Tabla 6. Descripción de tratamientos

Tratamiento A (TA)	SS cultivadas en ½ MS y luego de una semana de almacenamiento a 4°C, en ½ MS BAP:AG ₃
Tratamiento B (TB)	SS cultivadas en ½ MS y luego de dos semanas de almacenamiento a 4°C, en ½ MS BAP:AG ₃
Tratamiento C (TC)	SS cultivadas en ½ MS y luego de tres semanas de almacenamiento a 4°C, en ½ MS BAP:AG ₃

Control luz (T0 luz)	SS cultivadas en ½ MS BAP:AG ₃ e incubadas en condiciones de luz directamente
Control oscuridad (T0 osc)	SS cultivadas en ½ MS BAP:AG ₃ , incubadas en oscuridad absoluta acorde a los días del tratamiento en cuestión y luego transferidas a condiciones de luz.

4.7. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software estadístico Infostat. La diferencia estadística entre tratamientos se realizó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis (Kruskal y Wallis, 1952), dado que no se cumplieron los supuestos estadísticos para hacer un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Las diferencias con $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativas. El diseño experimental se adaptó a cada uno de los ensayos realizados. Cabe destacar que los análisis estadísticos se llevaron a cabo sólo cuando el número de explantes utilizados de cada variedad era idéntico, y contaban con al menos tres repeticiones; en caso contrario, se reportaron los resultados observacionales.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Desinfección

5.1.1. Desinfección para el aislamiento de meristemas

La contaminación microbiana es un problema constante que compromete el éxito del cultivo *in vitro*, y representa pérdidas notables de tiempo y económicas, por lo que las prácticas de desinfección superficial de los explantes constituyen el primer paso fundamental para el establecimiento aséptico del cultivo de cualquier especie.

El protocolo de desinfección del material vegetal adoptado en este trabajo para el posterior aislamiento de los meristemas resultó exitoso en las tres variedades estudiadas. Sólo en la variedad Nahuel se observó contaminación microbiana en 10 meristemas (11,11%). Tanto la variedad Traful como Mapuche no presentaron eventos de contaminación. Sin embargo, el análisis de esta variable mediante Kruskal Wallis, puso de manifiesto que no existen diferencias significativas entre ellas (p -valor 0,1190). Estos resultados podrían deberse al tipo de explante utilizado y a las características axénicas propias de este tejido. Además, Mroginski *et al.* (2004), indicaron que el tamaño del explante es un factor importante en el proceso de desinfección, dado que cuanto más pequeño es el mismo, menor es el riesgo de

contaminación, tal como ocurre con los explantes meristemáticos. En contraposición a los resultados aquí obtenidos, Svoboda (1992) registró sólo un 5,2% de explantes meristemáticos libres de contaminación en el cultivo *in vitro* de lúpulo. Esta diferencia, en parte puede deberse al protocolo de desinfección utilizado por este autor, dado que sólo incluía un tratamiento con etanol y luego con hipoclorito de sodio en bajas concentraciones y tiempos reducidos, sin el uso de fungicidas. Por otra parte, la contaminación observada en la variedad Nahuel fue relacionada con un error de manipulación durante la siembra del material vegetal.

5.1.2. Desinfección para el aislamiento de microestacas

A) Ensayos preliminares

Los ensayos preliminares permitieron identificar aquellos tratamientos donde se obtuvo microestacas libres de contaminación. De esta manera, de la Tabla 7 se desprende que, en la variedad Mapuche, el tratamiento preliminar 4 fue capaz de reducir en un 20% los explantes contaminados. Asimismo, en esta variedad, se observó que, del ensayo preliminar 1 al 4, hubo una disminución gradual del porcentaje de explantes contaminados, conforme aumentó la concentración de los agentes desinfectantes utilizados, mientras que, en Trafal y Nahuel, la contaminación se mantuvo en 100%. Estos resultados pueden estar relacionados con el desarrollo vegetativo de las plantas madres en las distintas variedades de lúpulo, debido a que, en la ciudad de Viedma, la variedad Mapuche inicia su etapa de brotación y culmina el proceso de floración de forma más tardía respecto a las otras variedades, como Trafal y Nahuel (A. Leiza, comunicación personal 16 de mayo de 2022; H. Testa comunicación personal 16 de mayo de 2022). Esto sugiere que, al momento de realizar los ensayos preliminares (1 a 4), se trabajó con material más joven de Mapuche, y podría entonces tener una menor carga de microorganismos, en comparación con las otras variedades, lo cual pudo haber influido en el proceso de desinfección, que resultó entonces, más exitoso en la variedad Mapuche. Respecto a ello, en varias oportunidades se ha asociado menores índices de contaminación de cultivos *in vitro* cuando éstos se iniciaban a partir de explantes juveniles (Marulanda *et al.*, 2010; López, 2007). Asimismo, Agrios (2005) mencionó que la desinfección de los tejidos puede verse afectada por ciertas condiciones climáticas como la temperatura (17 a 23°C) y la humedad relativa (>70%), debido a que éstas favorecen el desarrollo de microorganismos. No obstante, según el registro de la Estación Experimental Agropecuaria Valle Inferior del río Negro (Musi Saluj, 2022a), en los meses de muestreo (octubre, noviembre y diciembre), la humedad relativa no superó el 63%, mientras que la temperatura media se encontró en el rango antes mencionado, en el mes de

noviembre y diciembre (18,7°C y 22,1°C, respectivamente). Así, estos factores podrían influenciar indirectamente la respuesta a la desinfección de los explantes. Estos resultados difieren de los obtenidos por Oñate Marqués (2015), quien logró menores índices de contaminación en su trabajo de cultivo *in vitro* de lúpulo. Estas diferencias podrían deberse, por un lado, a que las variedades cultivadas no fueron las mismas a las utilizadas en este estudio, y por otro, a que este autor utilizó otras soluciones desinfectantes con diferentes modos de acción como la combinación de los fungicidas Captan 80 WP® y Benomilo 50 WP®, y un antibiótico de amplio espectro (Agrept 25 WP®), mientras que en este ensayo sólo se aplicó un fungicida sistémico (Carbendazim).

Si bien en el ensayo preliminar 4 se obtuvo el menor porcentaje de contaminación (80%) para la variedad Mapuche, éste no fue seleccionado como protocolo final de desinfección debido a que los tejidos aún no presentaban signos de daño producto del uso de los agentes desinfectantes, lo que permitió aumentar las concentraciones de los mismos a fin de obtener una desinfección más eficaz. En este sentido, el tratamiento preliminar seleccionado como punto de partida para determinar los futuros ensayos de desinfección, fue el del ensayo 5 (ver tabla 1), en el que se aumentó la concentración de hipoclorito de sodio utilizada. Este fue el único procedimiento en el cual se logró un mínimo porcentaje de microestacas libres de contaminación (10%) en la variedad Trafal. Estas diferencias en la respuesta a la desinfección podrían estar asociadas a la morfología del tallo de las variedades evaluadas. En este sentido, es conocido que las plantas pubescentes, como es el caso del lúpulo, constituyen un problema particular debido a que las soluciones desinfectantes tienen poca penetración a causa de la formación de burbujas de aire en el explante, motivo por el cual se suelen incorporar detergentes tensoactivos como el Tween® (Skirvin *et al.*, 1999). Al respecto, la caracterización morfológica (sección 4.3.3) demostró que las tres variedades presentaron los típicos tricomas peltados descritos para la especie, dispuestos sobre los surcos del tallo de sección hexagonal (Anexo 2). Sin embargo, la variedad Trafal, en la cual se obtuvo el menor porcentaje de contaminación en el ensayo 5, presentó una menor cantidad de tricomas por unidad de longitud (7 ± 1) respecto a las demás (9 ± 1), condición que pudo haber influido positivamente en el proceso de desinfección. De esta manera, el bajo porcentaje de microestacas libres de contaminación obtenido a partir de estos ensayos preliminares, indicarían la necesidad de desinfectar un número elevado de explantes, de forma tal que permita obtener un mayor número de microestacas desinfectadas con éxito para continuar con la micropropagación.

Tabla 7. Porcentajes de contaminación observados en los ensayos preliminares.

	Ensayo preliminar 1	Ensayo preliminar 2	Ensayo preliminar 3	Ensayo preliminar 4	Ensayo preliminar 5
Traful	100%	100%	100%	100%	90%
Nahuel	100%	100%	100%	100%	100%
Mapuche	100%	95%	88%	80%	100%

B) Protocolos finales

Los resultados de los ensayos preliminares permitieron definir nuevos protocolos para la desinfección de microestacas. Así, se llevaron a cabo los tratamientos T1 y T2, que variaron en el tiempo de exposición del material vegetal al fungicida (sección 4.3.1.2.). No obstante, ésto no permitió controlar completamente la presencia de microorganismos contaminantes, dado que al realizar las tres repeticiones (con un n=75 para cada tratamiento) se observó un 100% de explantes contaminados, en las tres variedades evaluadas. Estos resultados podrían deberse a que, en este estudio, se utilizó material proveniente de plantas madres cultivadas en el campo, a diferencia de otros autores como Horlemann *et al.* (2003), Roy *et al.* (2001), Gurriarán *et al.* (1999), y Martínez *et al.* (1999), quienes utilizaron plantas madres establecidas en condiciones de invernáculo. En este sentido, es conocido que las plantas de campo pueden contener una mayor carga microbiana que aquellas que se desarrollan bajo condiciones controladas y con una mejor calidad fitosanitaria que favorecen la desinfección (Adema, 2015). Asimismo, como se mencionó con anterioridad, la asepsia del material vegetal también puede verse influida por las condiciones climáticas del ambiente donde crecen las plantas madres (Agrios, 2005). En este sentido, el muestreo para llevar a cabo el primer tratamiento (T1) se realizó durante el mes de diciembre, con una temperatura media de 22,1°C y humedad relativa de 60,8% (Musi Saluj, 2022a); mientras que en el segundo caso (T2) se realizó en febrero, donde la temperatura y humedad relativa fueron de 19,9°C y 69,6%, respectivamente (Musi Saluj, 2022b). En ambos momentos, las condiciones podrían haber favorecido el desarrollo de microorganismos. Por otra parte, el tamaño del explante, y el desarrollo vegetativo del material de partida, pudieron haber influido en la desinfección dado que las microestacas tienen mayor tamaño que los meristemas (donde se logró obtener un alto porcentaje de

explantes libres de contaminación), y, también la presencia de tricomas que limitan el contacto de las soluciones desinfectantes con los tejidos (Mroginski *et al.*, 2004).

5.2. Inducción de respuestas morfológicas

5.2.1. Meristemas

5.2.1.1. Inducción de brotes múltiples

Dada la influencia que tienen las citocininas sobre la división y diferenciación celular, su utilización en la propagación *in vitro* es generalmente necesaria para inducir la formación de brotes adventicios, la multiplicación de tallos y la proliferación de yemas laterales.

Luego de un mes de ensayo, se observaron diferencias entre los meristemas cultivados en el medio suplementado con BAP (MIB) en relación con el control ($\frac{1}{2}$ MS) (Figura 6). En este sentido, se observó que explantes meristemáticos cultivados en MIB lograron diferenciarse en brotes que luego elongaron, no obstante, no se registró la formación de brotes múltiples (adventicios). Al respecto, Hirakawa y Tanno (2022) informaron que la aplicación de citocininas, como TDZ (thidiazuron) y BAP, fue capaz de inhibir la formación de yemas axilares y el desarrollo de brotes en secciones nodales de lúpulo en cultivo líquido, tal como fue observado en el presente estudio. Por el contrario, los meristemas cultivados en $\frac{1}{2}$ MS, no se diferenciaron, y, con el paso del tiempo, iniciaron un proceso de oscurecimiento de los tejidos por oxidación, con la inhibición del crecimiento y posterior necrosis y muerte de los mismos. Por dichos motivos, el análisis estadístico y la evaluación de las respuestas organogénicas pudo realizarse sólo con aquellos que se encontraban en MIB. En concordancia, Adams (1975) señaló que, en ausencia de BAP, el crecimiento de los meristemas de lúpulo fue escaso, y que varios cultivares diferentes respondieron favorablemente, cuando se utilizó una concentración de BAP $0,88 \mu\text{M}$, tal como se realizó en este estudio. De manera similar, Mafakheri y Hamidoghli (2015) señalaron que, si bien diversos cultivares de lúpulo silvestre se establecieron con éxito en medio MS libre de reguladores de crecimiento, fue necesario la adición de BAP ($4,44 \mu\text{M}$) y AIA ($0,57 \mu\text{M}$) para la etapa de multiplicación de las secciones nodales.

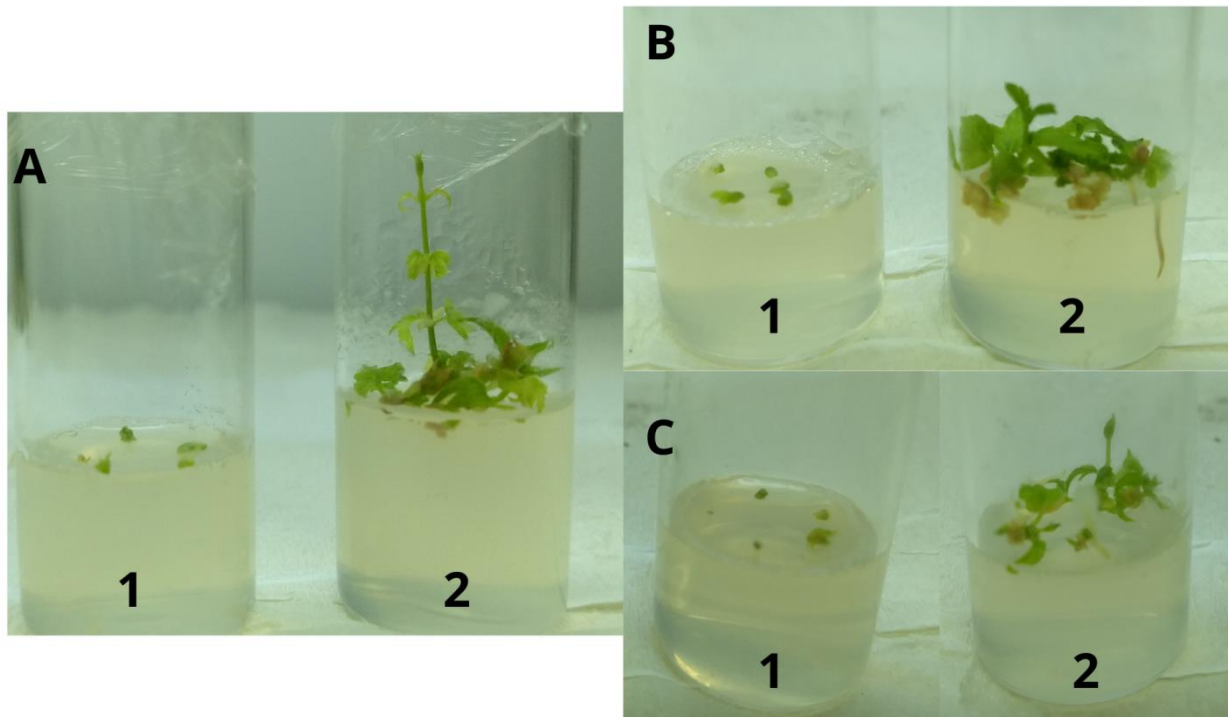


Figura 6. Respuesta morfogénica observada en el cultivo de explantes meristemáticos en MIB (1) y en $\frac{1}{2}$ MS (2) de las variedades Trafal (A), Nahuel (B) y. Mapuche (C)

De la Tabla 8 y Figura 7 se desprende que la mayor cantidad y porcentaje de explantes meristemáticos diferenciados en brotes, respectivamente, se observó en la variedad Trafal, seguido por las variedades Nahuel y Mapuche. Como es conocido, la respuesta al cultivo *in vitro* es genotipo dependiente, y ello podría explicar las diferencias observadas entre las variedades de lúpulo aquí estudiadas (Gurriarán *et al.*, 1999; Wirowski y Socha, 1991). Asimismo, Roca y Mroginski (1991), mencionaron que tanto la carga hormonal intrínseca como el ciclo reproductivo pueden también generar diferentes respuestas morfogénicas en el cultivo *in vitro* entre variedades. De manera similar a nuestro estudio, Grudzińska y Solarska (2005) y Oñate Marqués (2017), informaron que la capacidad de regeneración *in vitro* del lúpulo depende del cultivar utilizado y del periodo de muestreo. En este sentido, Melnychuk *et al.* (2013), sugirieron que la época más conveniente para el muestreo en cultivares de ciclo largo es el periodo primaveral, como en parte, fue realizado en nuestro trabajo (periodo de octubre a febrero). Durante la primavera, probablemente las auxinas sean las hormonas que predominen en el cultivo, debido a la previa ruptura de la dormancia de las yemas, pero hacia diciembre, época donde se comienza a inducir la floración del lúpulo, prevalecen las giberelinas (Oñate Marqués, 2017).

Tabla 8. Respuestas al CTV observadas durante la inducción de brotes

Variedad	Explantos diferenciados en brotes (n)	Explantos con formación de callo (n)
Traful	4,89 ± 0,33 ^b	1,78 ± 1,48 ^a
Nahuel	4,33 ± 1,66 ^{ab}	3,11 ± 1,36 ^b
Mapuche	3,78 ± 1,20 ^a	2,11 ± 0,78 ^a
p-valor	0,0368	0,0464

Los datos se expresan como la media ± desviación estándar (DE). Los valores con la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) al realizar Kruskal Wallis.

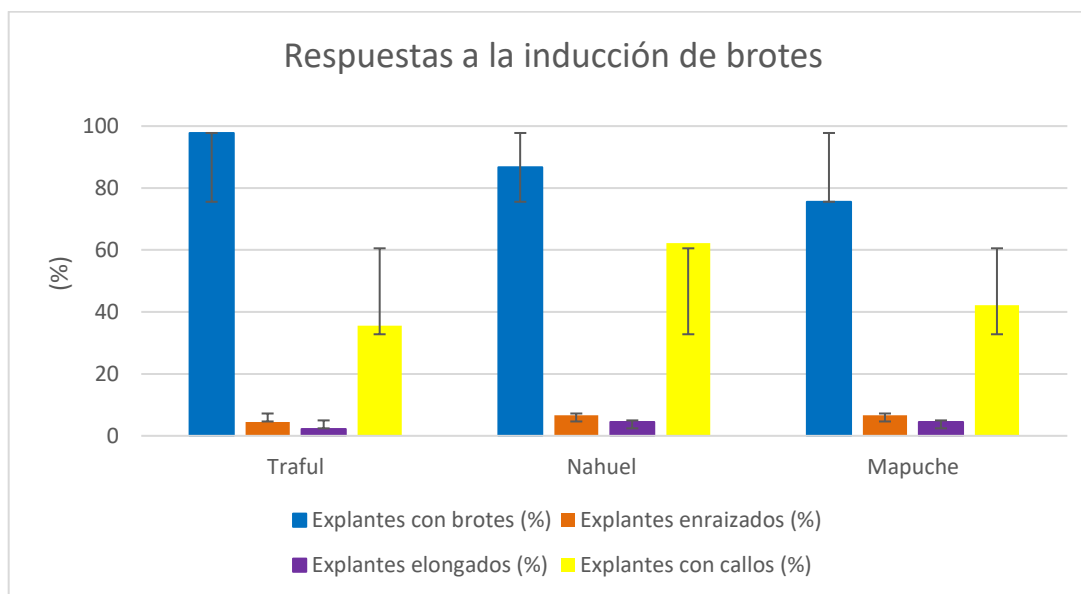


Figura 7. Respuestas al CTV observadas durante la inducción de brotes múltiples en cada variedad

Por otra parte, a pesar de que MIB es un medio para promover la inducción de brotes y que no contiene auxinas, se observaron eventos de enraizamiento y de elongación de entrenudos (Figura 7). Estas respuestas han sido informadas en literatura por Skoog y Miller (1957), y por Resmi y Nair (2011). Al respecto, explantes de las variedades Nahuel y Mapuche tuvieron porcentajes similares de enraizamiento (6,67%), mientras que Traful obtuvo un enraizamiento promedio menor (4,44%); sin embargo, no se hallaron diferencias significativas entre estos valores (p-valor 0,8425). La rizogénesis observada en medios desprovistos de auxinas, podría relacionarse con las altas concentraciones de esta hormona

propia de los meristemas, y con el equilibrio citocinina/auxina alcanzado (Su *et al.*, 2011; Echenique *et al.*, 2004). De manera similar, esta respuesta también fue observada por Adams (1975) en las variedades Wye Challenger y Bramling. Por otro lado, respecto a la elongación de entrenudos, en las variedades Nahuel y Mapuche se observó un 4,44% de explantes elongados mientras que Trafal presentó 2,22%; sin haberse determinado diferencias significativas entre estos porcentajes (p-valor 0,7970).

Por otra parte, el cultivo de meristemas en el medio de inducción de brotes (MIB) también produjo la formación de callos (Figura 8), que fue significativamente mayor en la variedad Nahuel (62,22%), mientras que Mapuche y Trafal presentaron 42,22% y 35,56%, respectivamente (p-valor 0,0464) (ver Tabla 8 y Figura 7). Estos resultados podrían deberse a la presencia de PGR en el medio de cultivo, en este caso BAP, dado que Fortes y Pais (2000), indicaron que, en ausencia de éstos, los explantes de lúpulo no produjeron callogénesis.

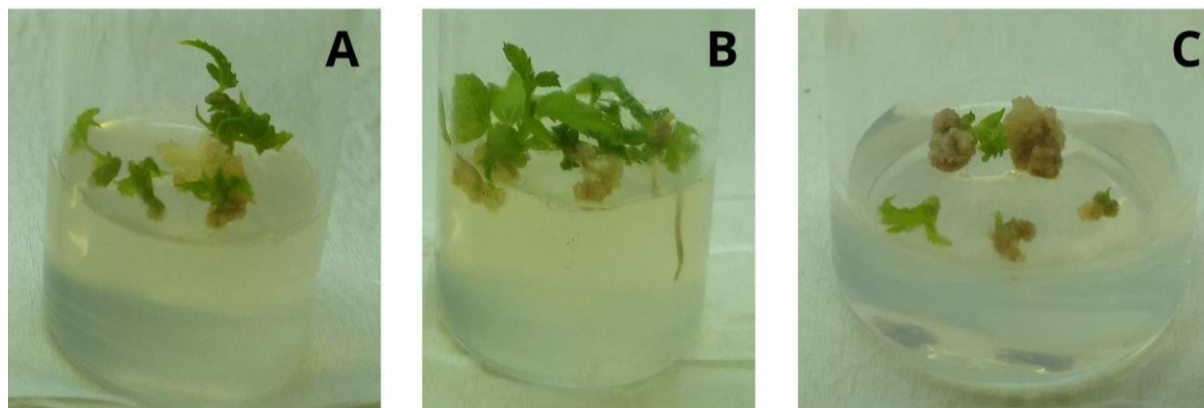


Figura 8. Callos observados en las distintas variedades de lúpulo al mes de cultivo en MIB (A: Trafal; B: Nahuel; C: Mapuche)

5.2.1.2. Elongación de entrenudos

Las giberelinas, y en especial el ácido giberélico (AG_3), son utilizadas en el cultivo *in vitro* de tejidos con el fin promover la elongación de los entrenudos e inducir el crecimiento meristemático, funciones que cumplen naturalmente en las plantas. Así, los brotes obtenidos a partir de la diferenciación de los meristemas en MIB, fueron transferidos a ME para inducir la elongación de entrenudos. Sin embargo, los porcentajes de explantes que elongaron en este medio fue bajo en las tres variedades evaluadas. La variedad Nahuel presentó el mayor porcentaje de explantes elongados (24,44%), respecto de Trafal

(17,68%) y Mapuche (6,67%) (Figura 9); no obstante, esta diferencia en los porcentajes no resultó significativa en términos estadísticos (p-valor de 0,0520). Por otra parte, la media de la altura de los brotes tampoco presentó diferencias significativas entre las variedades estudiadas (p-valor 0,2666), y sólo un número limitado de brotes (4,28%) alcanzaron una altura de 3-5 cm.

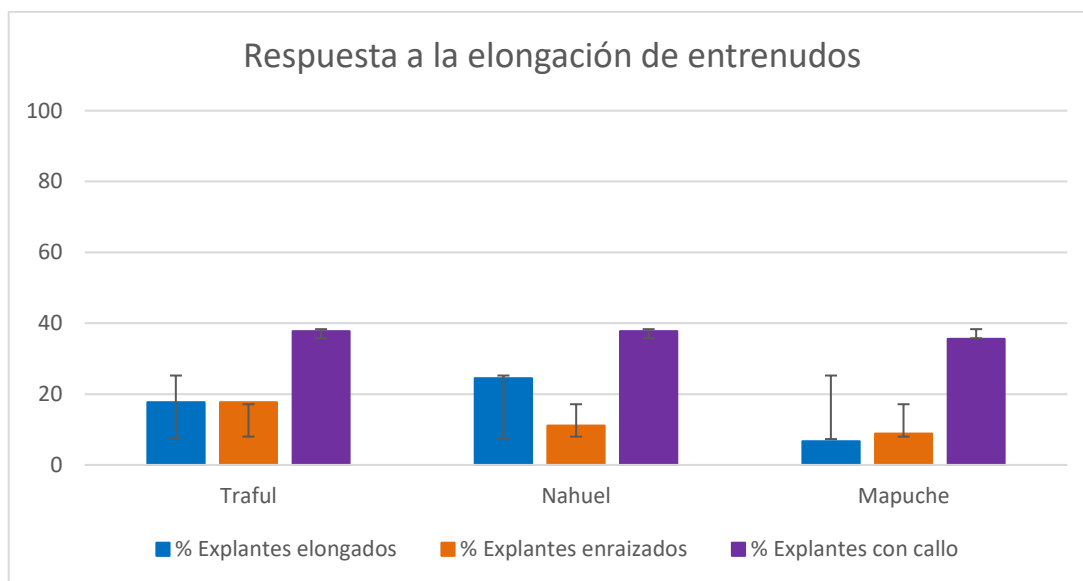


Figura 9. Respuestas al CTV observadas en la instancia de elongación de entrenudos

Al igual que en MIB, en ME se observaron algunos eventos de enraizamiento y formación de callo en las tres variedades (Figuras 9 y 11). Al respecto, los porcentajes alcanzados de enraizamiento fueron de 17,78%, 11,11% y 8,89% para las variedades Trafal, Nahuel y Mapuche, respectivamente. En cuanto a la formación de callos en la base de los brotes, los valores obtenidos fueron de 37,78%, para la variedad Nahuel y Trafal, y 35,56% para y Mapuche; no obstante, no se encontraron diferencias significativas tanto para el enraizamiento (p-valor 0,2558), como para la formación de callos entre variedades (p-valor 0,4421). Estos resultados difieren de los informados por Vine y Jones (1969), quienes observaron que los ápices de los brotes de lúpulo desarrollaron callos y raíces en ausencia de AG₃. En contraste, Guriarán *et al.*, (1999) y Batista *et al.*, (1996) observaron eventos de callogénesis en presencia de este regulador de crecimiento y vincularon esta respuesta con la concentración utilizada del mismo, tal como sucedió en nuestro estudio.

Por otra parte, respecto a la elongación de los brotes regenerados, se observaron diferencias en los resultados obtenidos entre los medios de cultivo utilizados (ME, MIB y ½ MS). En este sentido, como se observa en la Figura 10, las tres variedades evaluadas presentaron mayor porcentaje de elongación de los

entrenados, en presencia de AG₃ (ME), respecto al cultivo en ausencia de este regulador (MIB y ½ MS). De manera similar, Hirakawa y Tanno (2022) observaron que las yemas axilares provenientes de secciones nodales de lúpulo se desarrollaron en medios provistos de este regulador de crecimiento, pero no lo hicieron con BAP, e indicaron que la sensibilidad del desarrollo de brotes al AG₃ difiere según el cultivar de lúpulo utilizado. Asimismo, es preciso indicar que en ½ MS no se logró la elongación de entrenudos en ninguna de las variedades estudiadas, al igual que en la etapa de inducción de brotes múltiples (sección 5.2.1.1.). Por otra parte, en la variedad Mapuche, se registró un 6,67% y un 4,44% de brotes que elongaron en los cultivos en ME y MIB, respectivamente, no habiéndose encontrado diferencias significativas entre éstos (p-valor 0,1667). En contraste, en la variedad Traful se logró un 17,78% y un 2,22% de brotes elongados en los medios ME y MIB, respectivamente, valores que fueron significativamente diferentes (p-valor 0,0006). A su vez, en Nahuel los porcentajes alcanzados fueron de 24,44% y 4,44% en ME y MIB, respectivamente, y también se encontraron diferencias estadísticas (p-valor 0,0014). Como mencionó Adams (1975), estos resultados demuestran que el AG₃ es generalmente requerido para el cultivo de meristemas y que su necesidad depende del período de muestreo. Este autor determinó que los meristemas de lúpulo extraídos de material vegetal recolectado a principios del otoño requirieron AG₃ (2,89 a 72,17 µM) para completar su elongación, mientras que aquellos obtenidos en primavera lo hicieron en ausencia del mismo. Ello podría explicar la elongación de los brotes obtenidos en ausencia de AG₃ (MIB), dado que el material vegetal se recolectó durante la primavera, periodo en el que las plantas se encuentran en un estado reproductivo precoz, y las concentraciones endógenas de esta hormona se incrementan en la zona meristemática.

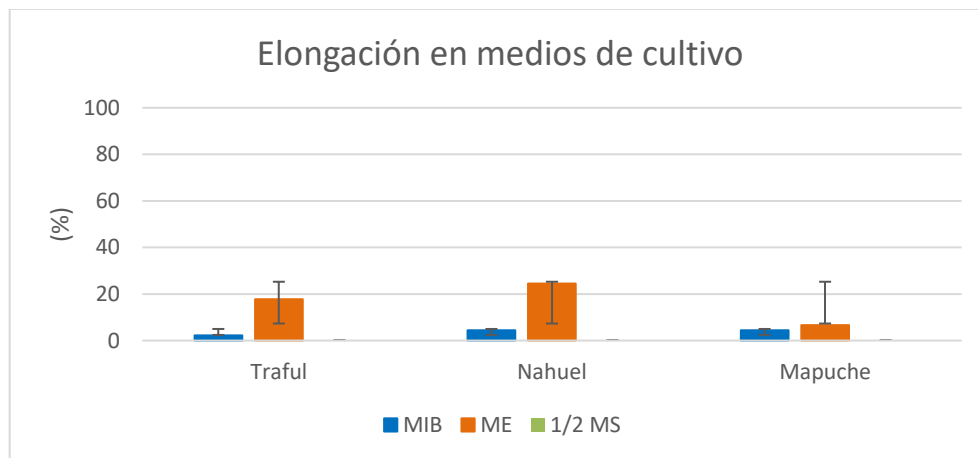


Figura 10. Porcentaje de brotes con elongación de entrenudos en los diferentes medios de cultivo (MIB, ME, ½ MS)

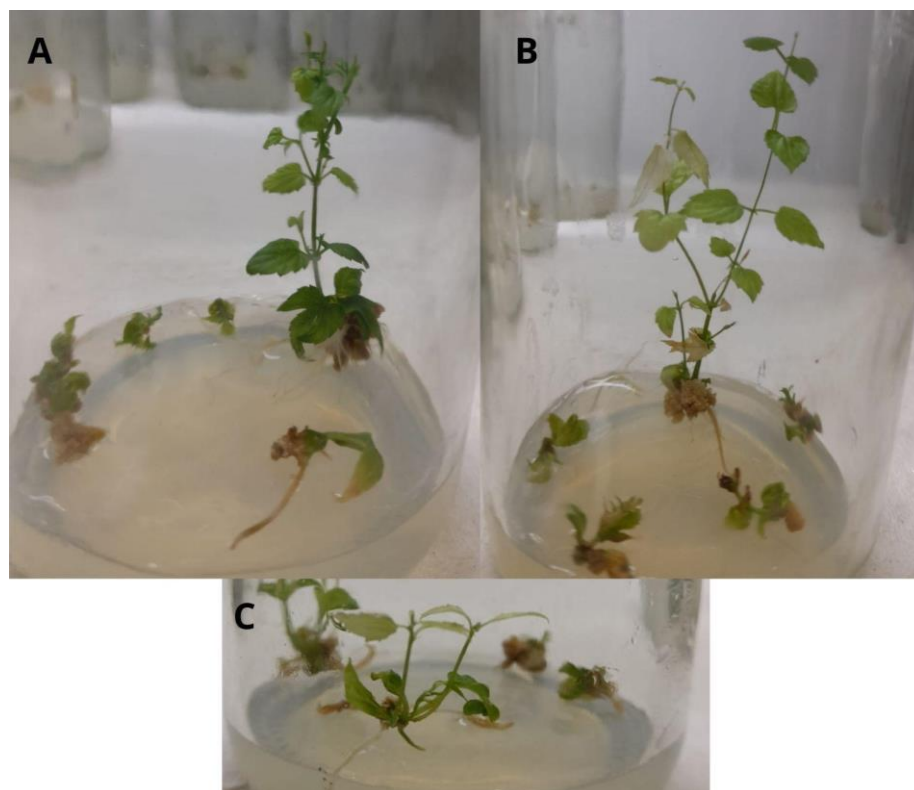


Figura 11. Elongación de entrenudos, enraizamiento y formación de callo observados durante el cultivo de brotes en presencia de AG3. (A) Nahuel, (B) Traful y (C) Mapuche

5.2.1.3. Enraizamiento de brotes

Por lo general, los PGR del tipo auxínico, son utilizados en la etapa del enraizamiento *in vitro* dado que estimulan la división celular de los tejidos y la diferenciación de raíces. Las auxinas sintéticas como IBA y 2,4-D resultan necesarias para el cultivo de meristemas y el crecimiento de ápices caulinares, no obstante, tienden a inducir la formación de callo en muchas especies.

Durante el cultivo de tejidos *in vitro*, puede ocurrir que el proceso de multiplicación y de enraizamiento transcurran en forma simultánea. En estos casos, los brotes producen raíces sin haber sido cultivados en medios adecuados para inducir esta respuesta. Por ello, únicamente aquellos brotes que contaban sólo con una raíz o carecían de las mismas, fueron transferidos a medios de enraizamiento, en dos etapas, tal como se indicó en la sección 4.4.1.3. Así, en este estudio se observó que los brotes que fueron cultivados en presencia de auxinas (IBA y 2,4-D), generaron un mayor porcentaje de enraizamiento respecto a aquellos que contaron con la combinación de auxinas y citocininas (IBA y BAP) en todas las variedades evaluadas (Figura 12). De manera similar, Adams (1975) informó el enraizamiento exitoso de los

meristemas de lúpulo en dos etapas. Sin embargo, este autor mencionó que aproximadamente un 57,14% de los brotes elongaron sus entrenudos y desarrollaron plantas completas en la segunda etapa de enraizamiento, eventos que no fueron observados en este estudio.

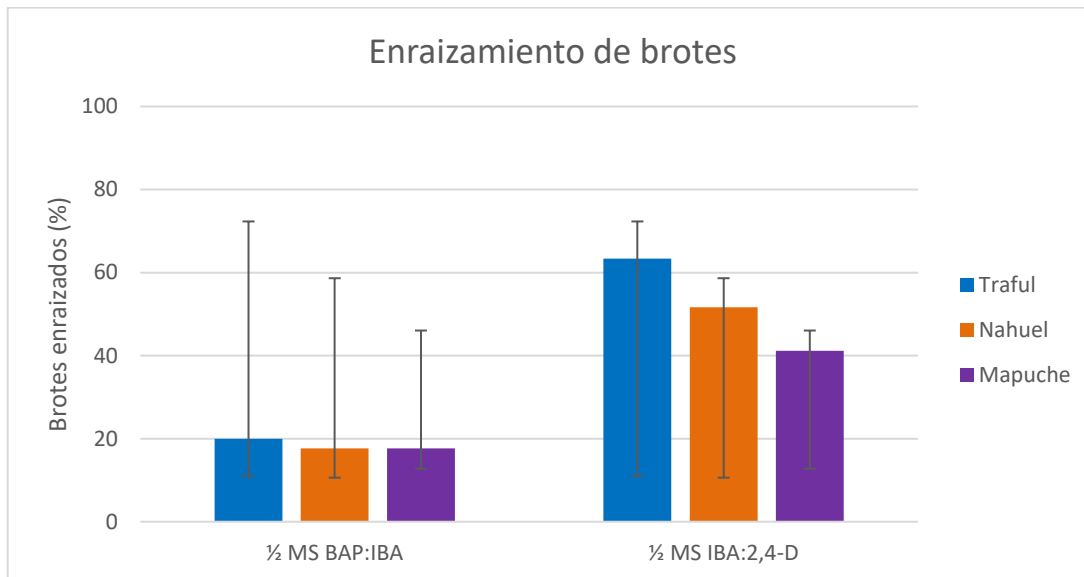


Figura 12. Enraizamiento logrado en brotes diferenciados de meristemas

Por otra parte, en la Tabla 9 se presentan los resultados de rizogénesis obtenidos ante el cambio de la intensidad de luz. Así, con la disminución de la intensidad lumínica producida en la segunda etapa, se observó un aumento en el enraizamiento de los brotes de las tres variedades (Figura 13). Al respecto, Monteuis y Bon (2000) señalaron que la baja intensidad lumínica, o incluso la oscuridad completa, puede ser utilizada como una estrategia para estimular el enraizamiento sólo en los cultivos *in vitro*, y que el tiempo de exposición a estas condiciones debe ser breve, tal como se realizó en este estudio, dado que luego de dos a tres semanas de oscuridad, los brotes pueden comenzar a degradarse, especialmente en medios de cultivo auxínicos. Asimismo, cabe destacar que el procedimiento realizado en dos etapas permitió alcanzar altos porcentajes de enraizamiento de los brotes en todas las variedades evaluadas, 83,34%, 69,25%, y 58,81% para Trafal, Nahuel y Mapuche, respectivamente, en un lapso de 60 días. En este sentido, Adams (1975), logró un 93,75% de meristemas enraizados a los 31 días de cultivo, con metodologías similares, en otras variedades de lúpulo.

Tabla 9. Porcentajes de enraizamiento alcanzados en cada etapa

	Enraizamiento: primera etapa (%)	Enraizamiento: segunda etapa (%)	
	Fotoperiodo 16/8 hs - 21 ± 2°C	Fotoperiodo 16/8 hs - 21 ± 2°C	Disminución intensidad lumínica
Traful	20	26,67	36,67
Nahuel	17,64	19,35	32,26
Mapuche	17,64	11,76	29,41

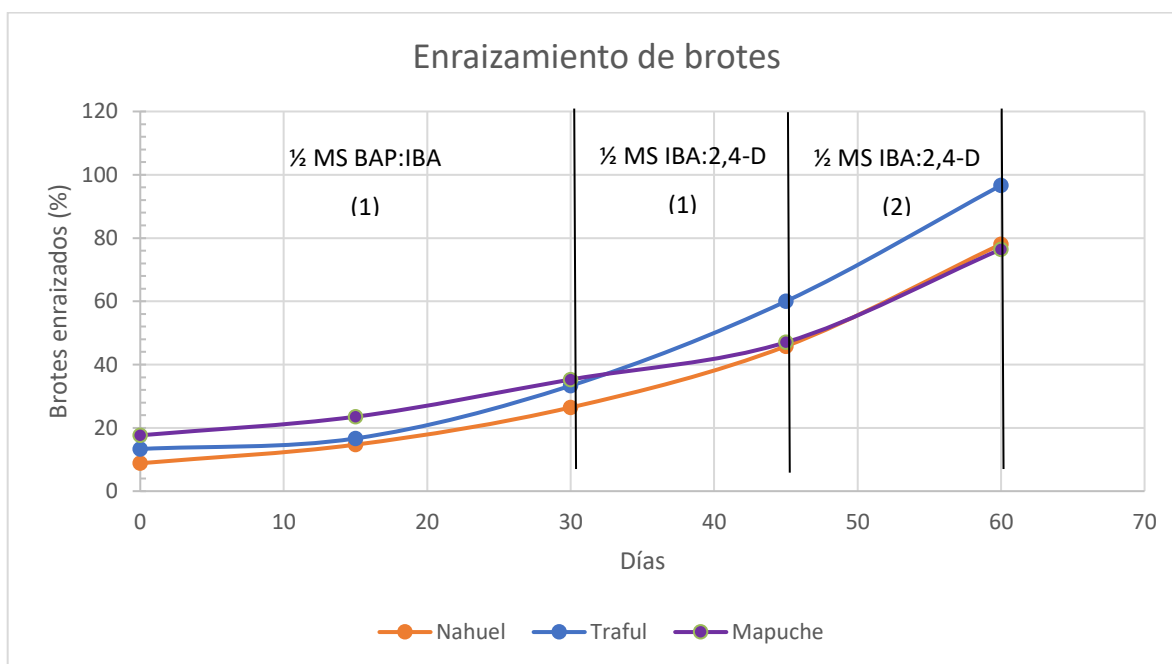


Figura 13. Dinámica del enraizamiento de brotes en dos etapas. (1) Incubación con fotoperiodo de 16hs luz/8hs oscuridad (2) Incubación con baja intensidad lumínica (semioscuridad)

Dado que también se observaron eventos de rizogénesis en las etapas de cultivo previas (sección 5.2.1.1 y 5.2.1.2.), se comparó el porcentaje de enraizamiento obtenido en los medios de inducción de brotes y de elongación de entrenudos (MIB y ME), con el alcanzado en medios auxínicos (½ MS BAP:IBA y ½ MS IBA:2,4-D). De la Tabla 10, se desprende que el enraizamiento fue mayor en presencia de auxinas. Como se ha mencionado con anterioridad, el enraizamiento en MIB y ME estaría relacionado con la carga hormonal intrínseca de los explantes, especialmente a la alta concentración de auxinas que

presentan típicamente los meristemas (Echenique *et al.*, 2004). Por otra parte, Adams (1975) señaló que los meristemas de lúpulo crecieron igual o aún mejor, en medios sin auxinas que en aquellos adicionados con éstas. Asimismo, Machado *et al.* (2018) observaron que las secciones nodales de la variedad Columbus enraizaron cuando se cultivaron en presencia de BAP, lo cual es congruente con los resultados aquí obtenidos de enraizamientos en medios libres de auxinas.

Tabla 10. Enraizamiento en diferentes medios de cultivo

	Enraizamiento (%)			
	MIB	ME	½ MS BAP:IBA	½ MS IBA:2,4-D
Traful	4,44	17,78	20	63,34
Nahuel	6,67	11,11	17,64	51,61
Mapuche	6,67	8,89	17,64	41,17

En los eventos de enraizamiento analizados con anterioridad, se observó la formación de raíces tanto de manera directa como indirecta (sección 1.3.2.). Así, cuando los explantes fueron cultivados en MIB, el 100% de los eventos de rizogénesis obtenidos fueron a través de la vía directa, mientras que cuando se trató de ME y de los medios auxínicos (½ MS BAP:IBA y ½ MS IBA:2,4-D), estos porcentajes disminuyeron para todas las variedades, de forma tal que predominó la vía indirecta (Tabla 11). Estos resultados indican que, conforme aumentó el tiempo de cultivo, y con ello la exposición de los tejidos a distintos reguladores de crecimiento, la formación de callo se incrementó y en consecuencia, la organogénesis indirecta. De forma similar a lo observado en este estudio, Adams (1975) señaló que en el cultivo de meristemas de lúpulo, las raíces emergieron de grandes masas de callo, cuando se usaron concentraciones relativamente altas de 2,4-D y AIA.

Por otra parte, pese a que la etapa de enraizamiento de brotes, en algunos casos, estuvo asociada a la callogénesis, también se obtuvieron callos que se mantuvieron indiferenciados y no produjeron raíces, del mismo modo que fue observado en las instancias previas del cultivo (inducción de brotes múltiples y elongación de entrenudos). En este sentido, de la evaluación de explantes que desarrollaron callo basal, se observó que esta respuesta morfogénica fue elevada en todas las variedades evaluadas (Figura 14). En la primera etapa de enraizamiento, es decir, en el cultivo en ½ MS BAP:IBA, se observó un 100%,

96,67%, y 91,18% de brotes con callo basal en las variedades Mapuche, Trafal, y Nahuel, respectivamente. En la segunda etapa (½ MS IBA:2,4-D), la incorporación de las dos auxinas al medio de cultivo elevó la formación de callo a un 100%, en todos los casos. Por otra parte, se observó que, conforme pasaron los días de cultivo en el medio auxínico, la callogénesis aumentó considerablemente, como se mencionó con anterioridad. Este resultado es congruente con lo observado por Adams (1975), quien indicó que los callos obtenidos en la base del explante aumentó rápidamente en condiciones semejantes.

Finalmente, es preciso señalar que, a pesar de haber logrado la formación de raíces, y con ello, la obtención de plantas completas, estos resultados no pudieron ser analizados estadísticamente debido a que, como se indicó en un principio, el número de brotes que llegaron a esta etapa de cultivo *in vitro* fue diferente entre las variedades estudiadas.

Tabla 11. Eventos de rizogénesis directa en los diferentes medios de cultivo (%)

	MIB	ME	½ MS BAP:IBA	½ MS IBA:2,4-D
Trafal	100	87,5	0	0
Nahuel	100	20	25	0
Mapuche	100	25	50	0

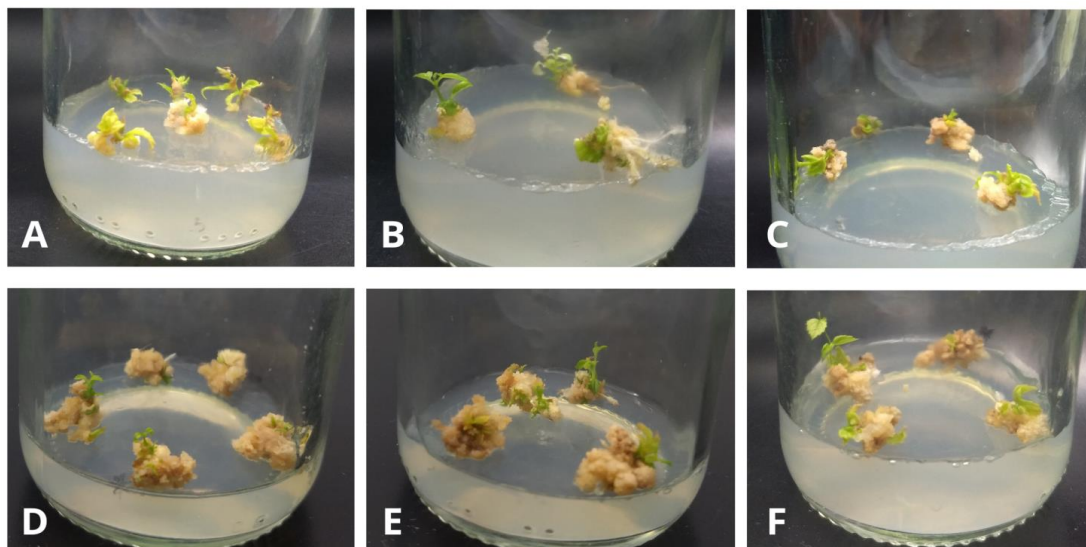


Figura 14. Brotes en instancia de enraizamiento con callo. A, B y C: primera etapa de enraizamiento (15 días); D,E y F: segunda etapa de enraizamiento (15 días). La variedad Trafal se observa en las figuras A y D; Nahuel en B y E, y Mapuche en C y F.

5.2.2. Microestacas procedentes del cultivo *in vitro*

5.2.2.1. Enraizamiento de microestacas

Si bien las auxinas son los reguladores de crecimiento utilizados para inducir el enraizamiento de los explantes, el porcentaje de microestacas enraizadas en nuestro trabajo, fue mayor en el medio desprovisto de reguladores de crecimiento ($\frac{1}{2}$ MS), respecto al medio auxínico ($\frac{1}{2}$ MS IBA:AIA). En este sentido, los porcentajes de explantes con raíces obtenidos en $\frac{1}{2}$ MS fueron del 100%, 80% y 40% en las variedades Mapuche, Nahuel y Traful, respectivamente (Tabla 12). En contraste, en presencia de auxinas, sólo se observó rizogénesis en Nahuel (50%) y Mapuche (30%). Estos resultados sugieren que la adición de este tipo de regulador de crecimiento no resulta imprescindible para inducir el enraizamiento de los explantes de estas variedades de lúpulo.

La formación de raíces durante esta etapa fue predominantemente a través de la organogénesis directa, situación opuesta a la observada en la etapa de enraizamiento de los brotes obtenidos a partir de meristemas (Tabla 12). De esta forma, en el ensayo control ($\frac{1}{2}$ MS), todos los explantes de las variedades evaluadas presentaron organogénesis directa (100%), mientras que en el medio auxínico ($\frac{1}{2}$ MS IBA:AIA), esta vía de regeneración se observó en la variedad Mapuche en un 100% de los explantes, y en Nahuel en un 40% (Figuras 15 y 16). Asimismo, de la Tabla 12 se desprende que la formación de callo fue la respuesta predominante en medios de tipo auxínicos, respuesta similar a la observada en el cultivo de los explantes meristemáticos. En $\frac{1}{2}$ MS IBA:AIA un total de 100%, 90% y 70% de explantes presentaron callos en las variedades Mapuche, Traful y Nahuel, respectivamente. Por el contrario, en el ensayo control solo se observó la formación de callos en la variedad Mapuche.

Los resultados obtenidos en este trabajo, al utilizar AIA ($4,9 \mu\text{M}$) e IBA ($5,7 \mu\text{M}$) para el enraizamiento de las secciones nodales de lúpulo, difieren de los descritos por Roy *et al.* (2011), quienes con esta misma combinación y concentración de auxinas obtuvieron un 100% de enraizamiento en explantes nodales de la variedad H138. Asimismo, estos autores indicaron que ambos reguladores de crecimiento resultan necesarios para inducir la rizogénesis, dado que cuando sólo se incorporó una de ellas, los porcentajes de enraizamiento disminuyeron notablemente. De manera similar, Gurriarán *et al.* (1999) informaron que los mayores porcentajes de enraizamiento de secciones internodales los obtuvieron en presencia de auxinas y citoquininas. Por otra parte, Horlemann *et al.* (2003) obtuvieron un porcentaje de enraizamiento semejante al observado en este trabajo en el tratamiento control (85-90%), cuando se

cultivaron brotes del genotipo “Tettninger”, pero con la diferencia que estos autores utilizaron IBA. No obstante, otros trabajos informan un enraizamiento exitoso sin la adición de PGR al medio de cultivo, tal como ha sido observado en nuestro estudio. Al respecto, Paredo *et al.* (2008) señalaron que en las variedades Nugget y Columbus, se logró la regeneración directa de raíces sin la formación de callo, a los 10 días de cultivo y en ausencia de reguladores de crecimiento. Cabe destacar que la obtención de raíces a partir de una vía de organogénesis directa resulta de importancia debido a que estos eventos limitan la variación somaclonal (Brar y Jain, 1998).

En síntesis, el enraizamiento de microestacas procedentes de material *in vitro*, es decir, a partir de las vitroplantas obtenidas en las etapas previas del presente estudio, fue exitoso en el medio control (½ MS) en las tres variedades evaluadas, en relación con los resultados obtenidos en ½ MS IBA:AIA. Al respecto, esta posibilidad de multiplicar material ya introducido al cultivo *in vitro* permite revertir la limitación impuesta por la desinfección de microestacas provenientes de campo (sección 5.1.2). Mapuche fue la variedad que presentó mayor porcentaje de explantes enraizados y en la que se observó callogénesis en ambos ensayos, respecto a las otras variedades evaluadas. No obstante, debido al número reducido de microestacas utilizadas en este ensayo, los resultados no pudieron ser analizados estadísticamente.

Tabla 12. Respuestas observadas en el cultivo *in vitro* de microestacas

	Trafal		Nahuel		Mapuche	
	½ MS IBA:AIA (ensayo)	½ MS (control)	½ MS IBA:AIA (ensayo)	½ MS (control)	½ MS IBA:AIA (ensayo)	½ MS (control)
Enraizamiento (%)	0	40	50	80	30	100
Organogénesis directa (%)	-	100	60	100	100	100
Formación de callo (%)	90	0	70	0	100	40

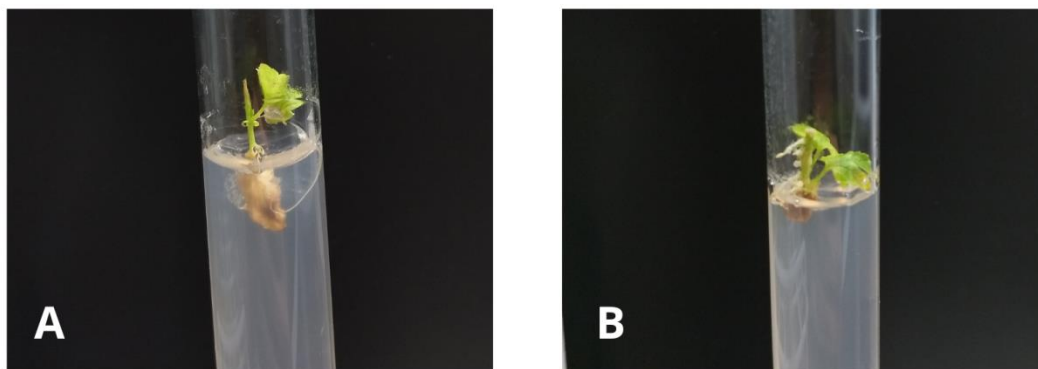


Figura 15. Enraizamiento de microestacas en $\frac{1}{2}$ MS IBA:AIA (15 días) A: Nahuel; B: Mapuche

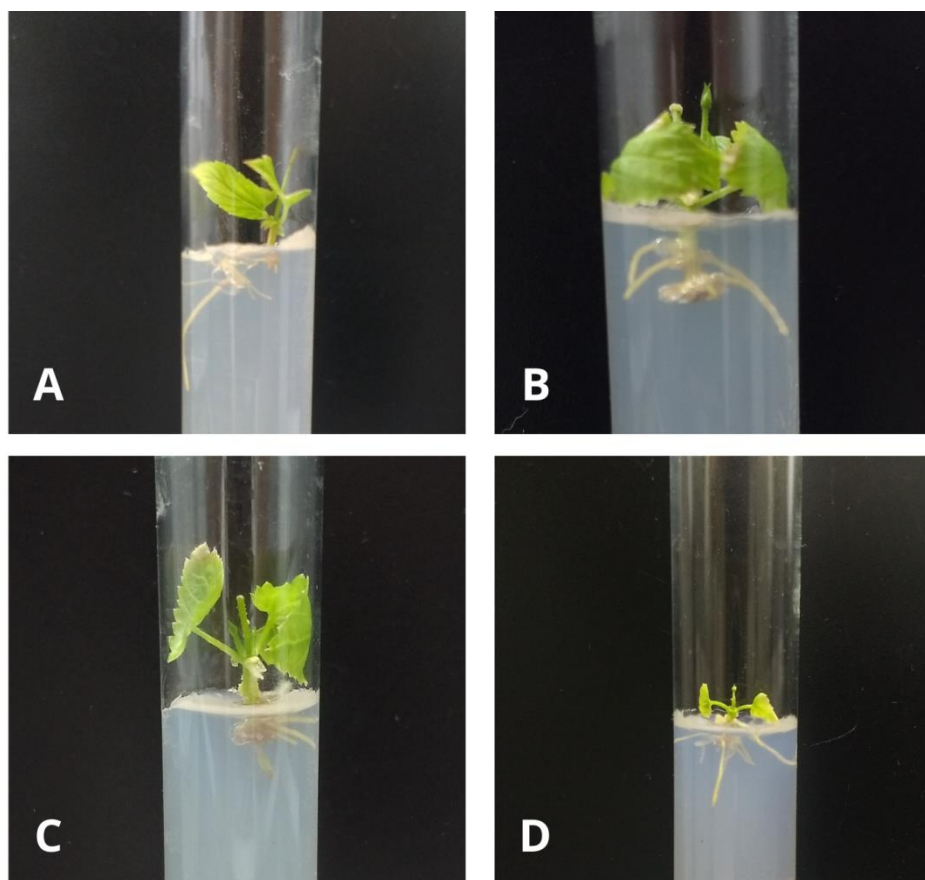


Figura 16. Enraizamiento de microestacas en $\frac{1}{2}$ MS (30 días). A: Raíz directa Nahuel; B: raíz directa Mapuche; C: raíz indirecta Mapuche; D: raíz directa Trafal

5.3. Aclimatación y rusticación de vitroplantas

La aclimatación y rusticación de plantas completas obtenidas del cultivo *in vitro* es un paso obligado para la adaptación de las mismas, previo a su exposición al ambiente *ex vitro*, debido a que bajo las condiciones del cultivo de tejidos, las plantas presentan algunas limitaciones anatómicas y fisiológicas. Durante el proceso de aclimatación, en medios con menor concentración de sacarosa y nutrientes, se observó que las plantas desarrollaron nuevas raíces, elongaron sus entrenudos y generaron hojas nuevas. No obstante, cuando éstas fueron transferidas a sustrato para su rusticación, se observaron algunos eventos de clorosis en las hojas (Figura 17 D). Estos resultados han sido vinculados con la falta de cutícula y ceras de las vitroplantas, y con la deficiencia en el control de la transpiración por las estomas (Castillo, 2004). Pese a ello, en esta instancia se obtuvo un 100% de supervivencia de las vitroplantas.

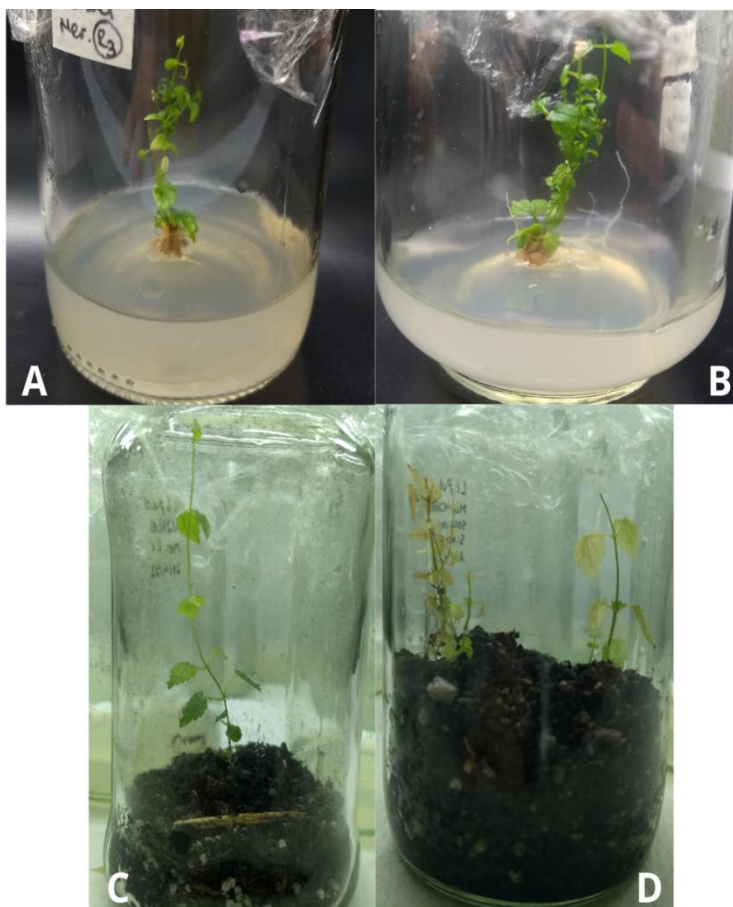


Figura 17. Vitroplantas. A. Aclimatación en $\frac{1}{2}$ MS Sac.20; B. Aclimatación en $\frac{1}{4}$ MS Sac.20; C: Rusticación en sustrato; D. Clorosis en vitroplantas durante la instancia de rusticación.

5.4. Obtención de semillas sintéticas

Las semillas sintéticas (SS), son capaces de germinar y convertirse en una planta completa cuando se les otorga las condiciones adecuadas, incluso luego de un periodo de almacenamiento de las mismas a bajas temperaturas (Figura 21). La viabilidad y la conversión de los tejidos meristemáticos encapsulados son unos de los aspectos más importantes de la tecnología de las semillas sintéticas, y depende, en gran medida, de factores como la luz, la temperatura y el periodo de almacenamiento. No obstante, éstos no influyen de igual manera en las distintas especies, variedades y tejidos vegetales utilizados, por lo que es de esperar diversas respuestas al llevar a cabo esta técnica. Por ello, en el presente trabajo se evaluó la respuesta de las SS al almacenamiento a 4°C durante una, dos y tres semanas (TA, TB y TC, respectivamente), realizando un control sin tratamiento de frío (T0 osc) (sección 4.6). Así, en la variedad Mapuche, los tratamientos TA y TB, produjeron un 90% de conversión, mientras que en TC y en el control en oscuridad (T0 osc), fue de 20% y 63%, respectivamente (Figura 18), siendo estos valores significativamente diferentes (p-valor 0,0299). Por otra parte, en la variedad Trafal, el mayor porcentaje de conversión se obtuvo en TB (50%), y el menor en TC (3,33%), situación similar a la observada en la variedad Mapuche (Figura 19); sin embargo, estos porcentajes no presentaron diferencias significativas (p-valor 0,0509). De la misma manera que se observó en las otras variedades, Nahuel logró el mayor porcentaje de conversión en TB (43,33%), y el menor en el TC (20%) (Figura 20). No obstante, no se hallaron diferencias significativas entre los valores de conversión alcanzados en los distintos tratamientos, con esta variedad (p-valor 0,1287).

La diferencia entre los porcentajes de conversión obtenidos en las distintas variedades de lúpulo, podrían deberse a que la respuesta de los explantes al cultivo *in vitro* es genotipo dependiente, como se ha mencionado con anterioridad (Gurriarán *et al.*, 1999; Wirowski y Socha, 1991). Asimismo, el bajo porcentaje de conversión alcanzado en las semillas de las variedades evaluadas, cuando fueron almacenadas durante 3 semanas a 4°C (TC), indica que los tratamientos con frío prolongados pueden afectar la viabilidad de los explantes, de acuerdo a lo señalado por Engelmann (1991). Por otra parte, el alto porcentaje de conversión de las semillas alcanzado, junto al éxito en la diferenciación y elongación de brotes, especialmente en los tratamientos TA y TB de la variedad Mapuche, podrían estar asociados a la combinación de giberelinas:citocininas (AG₃:BAP) utilizada y a la respuesta genotipo dependiente. En este sentido, Hirakawa y Tanno (2022) señalaron que la incorporación de AG₃ y citoquinina en el medio de cultivo es útil para la proliferación de brotes de lúpulo. Por otra parte, Martínez *et al.* (1999)

establecieron un procedimiento para la crioconservación de esta especie, mediante la técnica de encapsulación/deshidratación de ápices obtenidos del cultivo *in vitro*. De acuerdo a estos autores, la tasa de supervivencia de la variedad Nugget fue del 95-100%, valores similares a los obtenidos en este estudio para la variedad Mapuche en TA y TB, a pesar de las diferencias en el método de conservación y tipo de cápsula realizada. Por otra parte, Martínez *et al.* (1999) informaron que el crecimiento de los ápices encapsulados fue similar entre los tratamientos realizados y los controles, tal como se observó aquí para las variedades Nahuel y Traful. Asimismo, Liberatore *et al.* (2020), encapsularon microestacas de lúpulo del genotipo “Gianni” derivadas del cultivo *in vitro*, en una matriz suplementada con sacarosa y reguladores de crecimiento e informaron una alta viabilidad de todos los explantes encapsulados (100%). En este sentido, Lata *et al.* (2009) llevaron a cabo la encapsulación de secciones nodales de *Cannabis sativa*, una especie de la misma familia del lúpulo (*Cannabaceae*), en una matriz con TDZ y registró una conversión del 77%. Cabe destacar que en la variedad Mapuche (TA y TB) se obtuvieron valores de conversión similares a los reportados por estos autores, y ello se logró con metodologías más simples y económicas, como el encapsulamiento en alginato de sodio al 2%, sin el agregado de otros compuestos en la matriz.

Respecto al porcentaje de conversión diario obtenido en las tres variedades, en los diferentes tratamientos, se observó que Nahuel y Mapuche presentaron un mayor porcentaje de conversión a los 14 días de incubación en condiciones controladas de luz y temperatura en TA, TB y TC (Anexo 3, Gráficos A y B). No obstante, en T0 osc, Nahuel alcanzó el mayor porcentaje de conversión a los 21 días, mientras que la variedad Mapuche lo hizo luego de 7 días de iniciado el ensayo. Por otra parte, la variedad Traful obtuvo su mayor conversión a los 7 días de incubación, en los tratamientos en TA y TB, mientras que en TC y T0 osc éste se alcanzó a los 21 días (Anexo 3, Gráfico C). Al respecto, Martínez *et al.* (1999) señalaron que las primeras hojas comenzaron a emerger de las cápsulas a los 7 días, de manera similar a lo observado en este estudio, en los tratamientos TA y TB para la variedad Traful, y en T0 osc., en la variedad Mapuche. Por otra parte, Lata *et al.* (2009) informaron que la conversión ocurrió a los 21 días del cultivo, de forma similar a los resultados obtenidos en este trabajo para las variedades Nahuel y Traful en T0 osc, y en TC, para el caso de Traful.

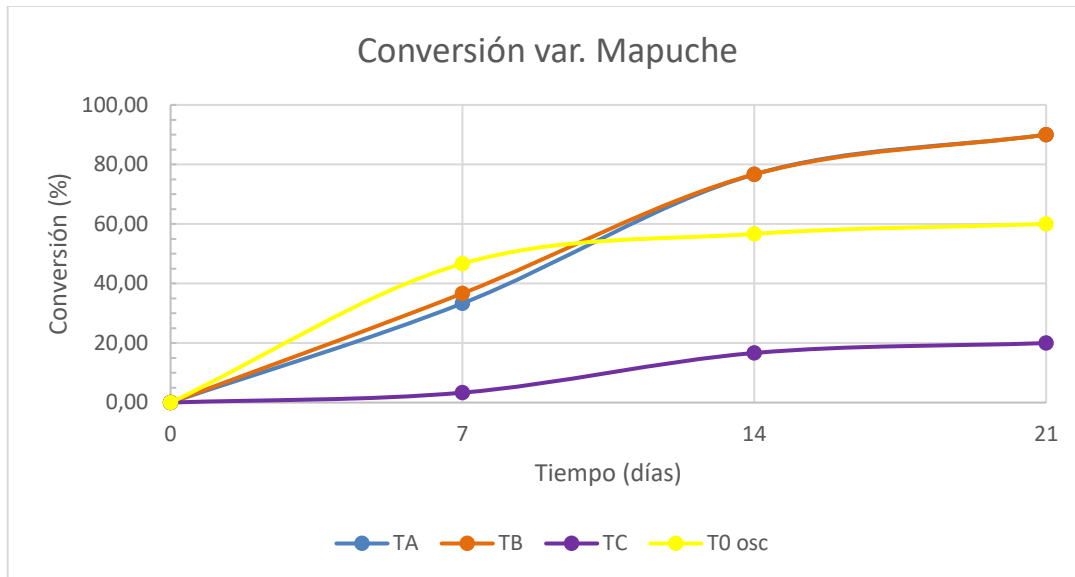


Figura 18. Conversión de semillas sintéticas var. *mapuche*

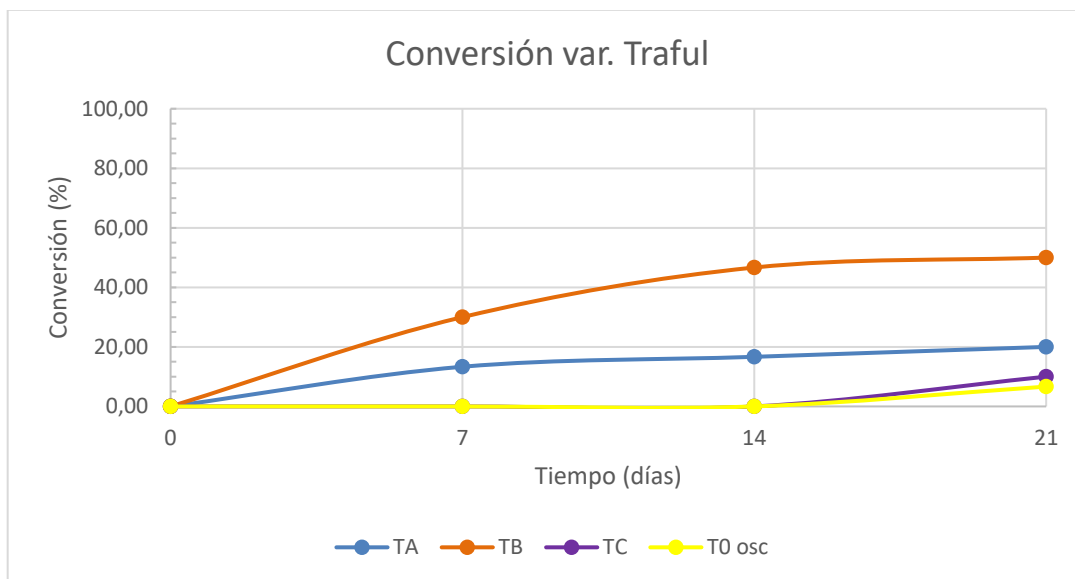


Figura 19. Conversión de semillas sintéticas var. *traful*

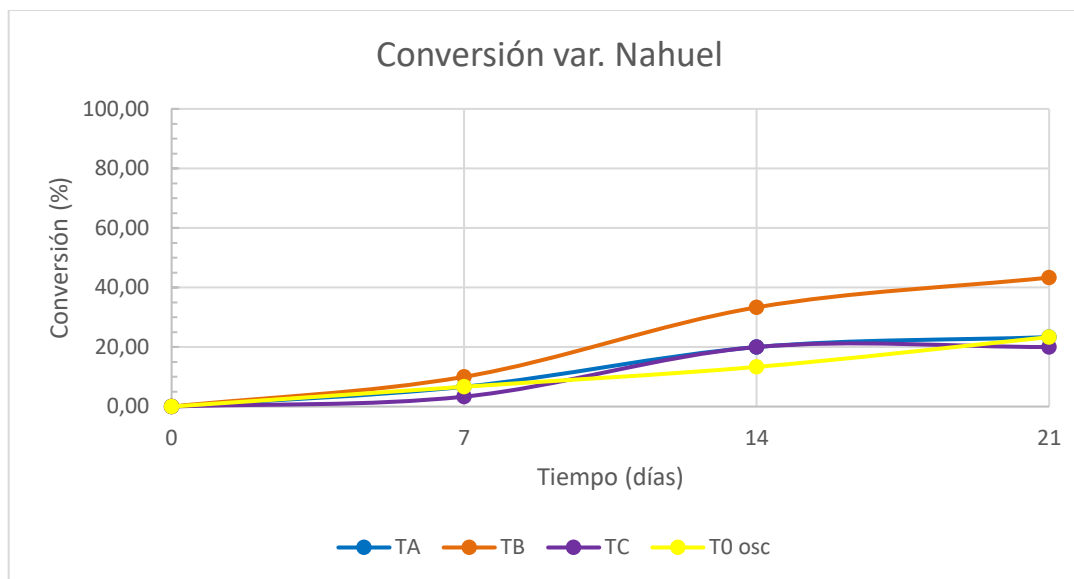


Figura 20. Conversión de semillas sintéticas var. *nahuel*

Por otra parte, la oxidación de los tejidos compromete la viabilidad de los explantes, y ella depende de varios factores como la luz y la temperatura (Tabla 13). Entonces, dado que para el establecimiento de estrategias de conservación se requiere someter las semillas sintéticas a bajas temperaturas, resulta necesario conocer la incidencia de este factor sobre los explantes de lúpulo. Al respecto, en la variedad Nahuel, se observó que la oxidación fue del 3,33 % en TA y nula en los demás tratamientos a 4°C (TB y TC). No obstante, cuando las semillas no fueron almacenadas en frío (T0 osc.), la oxidación de los tejidos fue mayor (36,67%). Esto mismo ocurrió en la variedad Mapuche, en la cual se observó el mayor porcentaje de oxidación (10%) en este tratamiento. Sin embargo, el almacenamiento de las semillas sintéticas de esta variedad a 4°C, sólo produjo oxidación de los tejidos en TB, y en un bajo porcentaje (3,33%). Estos resultados podrían estar influenciados por el tamaño final de los explantes encapsulados, dado que éste varía en función de la manipulación necesaria para el aislamiento de los mismos. Por otra parte, en la variedad Trafal, la mayor oxidación (36,67%) se evidenció en TC, es decir, cuando las semillas sintéticas fueron almacenadas en frío durante tres semanas, mientras que en los tratamientos con un menor tiempo a 4°C (1 y 2 semanas; TA y TB respectivamente), no se registraron eventos de oxidación, como así tampoco en T0 osc. Estas respuestas podrían estar relacionadas con la exposición de los explantes a bajas temperaturas por períodos prolongados, la cual puede generar daños fisiológicos y cambios en el metabolismo (Engelmann 1991).

Otros de los aspectos evaluados en las semillas sintéticas fue el porcentaje de enraizamiento de los brotes que emergieron de la cápsula, sin la incorporación de auxinas en el medio de cultivo (Figura 21 E). En este sentido, las variedades Traful y Nahuel no registraron eventos de enraizamiento, mientras que Mapuche lo hizo en un 10%, cuando las semillas fueron almacenadas durante dos semanas a 4°C (TB). Cabe destacar que, en estos casos, la formación de raíces se produjo vía organogénesis directa, es decir, sin la presencia de callo, resultado similar al observado por Martínez *et al.* (1999) en la variedad Nugget.

Tabla 13. Oxidación de explantes

Tratamiento	Oxidación (%)		
	Traful	Nahuel	Mapuche
TA	0 ^a	3,33 ^{ab}	0,00
TB	0 ^a	0 ^a	3,33
TC	36,67 ^b	0 ^a	0
T0 osc	0 ^a	36,67 ^b	10,00
p-valor	0,0132	0,0254	0,5296

Los valores con la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) al realizar Kruskal Wallis.

Respecto a la influencia de la luz sobre la calidad de las semillas sintéticas, evaluada en los tratamientos control (T0 luz y T0 osc), no se encontraron diferencias estadísticas significativas para las variables analizadas (conversión, oxidación y enraizamiento) (Tabla 14). Estos resultados sugieren que, entre los aspectos que inciden sobre la oxidación de los explantes encapsulados, las condiciones de luz no constituyeron un factor crítico que afecte la viabilidad de los tejidos.

En síntesis, se observó que Mapuche fue la variedad en la que se obtuvo mayor conversión y menor oxidación de los tejidos, cuando las semillas sintéticas fueron almacenadas a bajas temperaturas. Asimismo, en este ensayo se evidenciaron algunos eventos de enraizamiento en esta misma variedad.

Tabla 14. Comparación de controles

	Traful			Nahuel			Mapuche		
	T0 luz	T0 osc	p-valor	T0 luz	T0 osc	p-valor	T0 luz	T0 osc	p-valor
Conversión (%)	13,33	6,67	0,6	13,33	23,33	0,15	53,33	63,33	>0,999
Oxidación (%)	16,67	0	0,4	3,33	36,67	0,1	10	10	>0,999
Enraizamiento (%)	0	0	sd	0	0	sd	0	0	sd

Los valores dentro de la misma fila no son significativamente diferentes (con $p < 0,05$) al realizar Kruskal Wallis.

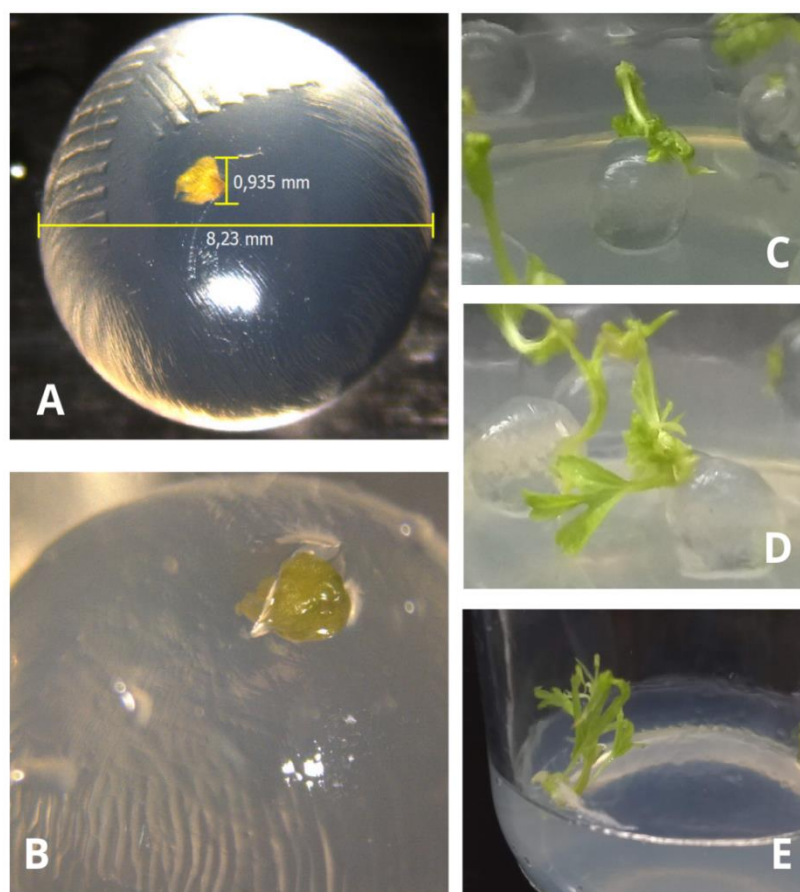


Figura 21. Semillas sintéticas de lúpulo. A: dimensiones de una semilla sintética; B: rotura de la matriz de alginato de sodio por el explante; C y D: crecimiento y elongación del explante; E: enraizamiento de brotes derivados de semilla sintética

6. CONCLUSIONES

En base en los resultados obtenidos en este estudio, se logró determinar que:

- Es posible aplicar protocolos de propagación y conservación para las variedades nacionales de lúpulo (*Humulus lupulus*) Mapuche, Nahuel y Traful.
- La vía de regeneración más rápida y económica para el cultivo *in vitro* de lúpulo es aquella que se inicia a partir de secciones nodales o microestacas, dado que no es necesario la adición de reguladores de crecimiento para la obtención de plantas completas.
- Dado que la respuesta al CTV es genotipo dependiente, dentro de las variedades nacionales aquí estudiadas, Mapuche respondió más favorablemente tanto para la producción y almacenamiento de semillas sintéticas, como para la propagación agámica vía secciones nodales, mientras que Traful y Nahuel lo hicieron en el cultivo de meristemas.
- Si bien la introducción de los meristemas al cultivo *in vitro* fue posible, y ello permite la producción de plantas libres de virus, esta metodología presentó ciertas limitaciones respecto a la viabilidad y respuesta de los explantes.
- En las condiciones estudiadas en el presente trabajo, la adición de PGR como BAP, resultó necesaria para el inicio del cultivo de meristemas debido a que, sin ellos, no se produjo la diferenciación celular, y posterior desarrollo y elongación de brotes. No obstante, la adición de BAP no generó brotes adventicios múltiples y, en cambio, indujo la formación de callos.
- Los bajos porcentajes de brotes elongados en las tres variedades indicarían que el AG₃ podría no ser el regulador adecuado para promover esta respuesta.
- La disminución de la intensidad lumínica durante la fase de enraizamiento de los brotes derivados del cultivo de meristemas influyó satisfactoriamente sobre la rizogénesis.
- Las semillas sintéticas obtenidas a partir de meristemas podrían sustituir satisfactoriamente la propagación asexual por rizomas, garantizando, de esta manera, la sanidad del material vegetal, especialmente en la variedad Mapuche, aspecto de importancia dado que ésta es una de las más utilizadas en el sector cervecero artesanal.
- La posibilidad de multiplicar secciones nodales de plantas previamente establecidas en condiciones *in vitro*, permite contar con una alternativa de multiplicación masiva y eficiente para las variedades nacionales aquí estudiadas, a pesar del bajo éxito en la desinfección obtenido en los explantes procedentes de campo.

- Este trabajo constituye el primer reporte sobre el cultivo *in vitro* de las variedades de lúpulo (*Humulus lupulus*) de origen argentino: Traful, Nahuel y Mapuche, y los primeros avances en el conocimiento de la propagación asexual como una alternativa a la propagación agámica tradicional por rizomas de estas variedades.

7. RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos nos permiten establecer algunas recomendaciones a tener en cuenta para el establecimiento de futuros ensayos de propagación de lúpulo:

- Las dificultades de contaminación inherentes a la utilización de secciones nodales o microestacas podrían resolverse si se utiliza material vegetal en óptimo estado fitosanitario, como rizomas y plantas madres previamente saneadas y mantenidas en condiciones de invernáculo. Asimismo, se podrían incorporar otros agentes desinfectantes tendientes a optimizar el protocolo de desinfección, como por ejemplo un antibiótico, como puede ser sulfato de gentamicina.
- Cuando el objetivo del estudio sea la multiplicación clonal, deberán ajustarse el tipo y las concentraciones de los reguladores de crecimiento utilizados para el cultivo de meristemas, a fin de reducir la callogénesis, y con ello, las posibilidades de variación somaclonal.
- Los resultados obtenidos en el ensayo de las semillas sintéticas, abren la posibilidad de explorar el efecto de la incorporación de BAP y AG₃ en forma conjunta en la matriz de encapsulación.
- Dado que las secciones nodales respondieron exitosamente al cultivo de tejidos, la posibilidad de introducir material vegetal procedente de invernáculo, permitiría la multiplicación clonal económica de lúpulo, mediante la técnica de semillas sintéticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, A. N. (1975). Elimination of viruses from the hop (*Humulus lupulus*) by heat therapy and meristem culture. *Journal of Horticultural Science*, 50(2), 151–160. <https://doi.org/10.1080/00221589.1975.11514616>
- Adema, M. (2015). ¿Por dónde empezamos? Establecimiento de cultivo *in vitro* - Plantas madres. Explantes. En Sharry S., Adema M. y Abedini W. (Eds). *Plantas de probeta* (pp 85)

- Adriani M, Piccioni E, Standardi A (2000) Effects of different treatment on the conversion of 'Hayward' kiwifruit synthetic seeds to whole plants following encapsulation of *in vitro*-derived buds. *N Z J Crop Horti Sci* 28:59–67
- Agehara, S., Acosta-Rangel, A., Gallardo, M., y Vallad, G. (2020). Selection and Preparation of Planting Material for Successful Hop Production in Florida. *EDIS*, 2020(5).
- Agrios, G. (2005). Capítulo 7: Efecto del ambiente en el desarrollo de la enfermedad en la planta. *Fitopatología*. Editorial Limusa. (5ta ed., pp 149-156).
- Alatar, A. A., y Faisal, M. (2012). Encapsulation of *Rauvolfia tetraphylla* microshoots as artificial seeds and evaluation of genetic fidelity using RAPD and ISSR markers. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(7), 1367-1374.
- Antonietta G.M., Manuel P., y Alvaro S. (1999). Effect of encapsulation on *Citrus reticulata* 'Blanco' somatic embryo conversion. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, 55: 235-237.
- Basiglio, M.A. (2015). Una opción para cada desafío - Tipos de cultivo *in vitro*. En Sandra Sharry, Marina Adema, Walter Abedini (Eds.), *Plantas de probeta* (121-122 pp.). Editorial de la Universidad de La Plata.
- Batista, D; Sousa, M; Pais, M. 1996. Plant regeneration from stem and petiole derived callus of *Humulus lupulus* L. (Hop) clone Bragança and var. Brewer's Gold. Departamento de Biologia Vegetal, Facultad de Ciencias de Lisboa. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant* 32:37-41.
- Benedetto, V. El lúpulo y su potencial. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca Argentina. Consultado el 9 de septiembre de 2021. <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Publicaciones/revistas/nota.php?id=189>
- Benedetto, V. El lúpulo y su potencial. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca Argentina. Consultado el 9 de septiembre de 2021. <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Publicaciones/revistas/nota.php?id=189>

- Bocconi, M. (2020, 6 de noviembre) El lúpulo argentino con buena nota a nivel internacional. CONICET - Ciencias agrarias, de la ingeniería y de materiales. Consultado el 5 de octubre de 2021. <https://www.conicet.gov.ar/el-lupulo-argentino-con-buena-nota-a-nivel-internacional/>
- Bocquet, L., Sahpaz, S., Hilbert, J. L., Rambaud, C., y Rivière, C. (2018). *Humulus lupulus L.*, a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology. *Phytochemistry reviews*, 17(5), 1047-1090.
- Boeri (2015) Nutrientes para las plantas de probeta. Medios de cultivo - Reguladores de crecimiento. En Sharry S., Adema M. y Abedini W. (Eds). *Plantas de probeta* (pp 54-56)
- Braam, J. (2005). In touch: plants responses to mechanical stimuli. *New Phytologist Foundation*. <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.2004.01263.x>
- Brar DS, y Jain SM. Somaclonal variation: mechanism and applications in crop improvement. In: Jain SM, Brar DS, Ahloowalia BS (Eds). Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Dordrecht: *Kluwer Academic Publishers*; 1998. p.15–24.
- Cámara de la Industria Cervecera Argentina (2020). Agroindustria cervecera. Análisis de cadena de valor. *FIEL – ABECEB*. <http://www.cervecerosargentinos.org/quienes-somos>
- Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *INIA, Uruguay*.
- del Valle, J. M., Rivera, O., Teuber, O., y Palma, M. T. (2003). Supercritical CO₂ extraction of Chilean hop (*Humulus lupulus*) ecotypes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(13), 1349-1356.
- Dodds, K. (2017). Hops a guide for new growers. Development Officer – Temperate Fruits NSW Department of Primary Industries. Australian Government. https://www.dpi.nsw.gov.au/_data/assets/pdf_file/0007/712717/hops-guide-for-new-growers.pdf
- Eastwell, K. C., and D. J. Barbara. 2015a. “Apple Mosaic Virus.” In *Field Guide for Integrated Pest Management in Hops*, 3rd Ed., edited by S. D. O’Neal, D. B. Walsh, and D. H. Gent. Yakima, WA: US Hop Industry Plant Protection Committee.

- Eastwell, K. C., y Barbara, D.J. (2015b). “Carlavirus Complex: American Hop Latent Virus, Hop Latent Virus, and Hop Mosaic Virus.” In *Field Guide for Integrated Pest Management in Hops*, 3rd Ed., edited by S. D. O’Neal, D. B. Walsh, and D. H. Gent. Yakima, WA: US Hop Industry Plant Protection Committee.
- Echenique, V., Rubinstein, C., Mroginski, L., Levitus, G., y Hopp, E. (2004). Biotecnología y mejoramiento vegetal II. *Ediciones INTA*.
- Engelmann, F. (1991). *In vitro* conservation of tropical plant germplasm – a review. *Euphytica* 57:227-243
- Faragó, J., Psenáková, I., y Faragová, N. (2009). The use of biotechnology in hop (*Humulus lupulus* L.) improvement. *Nova Biotechnologica*, 9(3), 279–293.
- Fortes, A. M., y Pais, M. S. (2000). Organogenesis from internode-derived nodules of *Humulus lupulus* var. Nugget (*Cannabaceae*): Histological and changes in the starch content. *American Journal of Botany*, 87(7), 971-979. <https://doi.org/10.2307/2656996>
- Gent, D. H., D. A. Johnson, Gevens A. J., y Hausbeck, M. K. (2015). “Downy Mildew.” In *Field Guide for Integrated Pest Management in Hops*, 3rd Ed., edited by S. D. O’Neal, D. B. Walsh, and D. H. Gent. Yakima, WA: US Hop Industry Plant Protection Committee.
- Gent, D. H., Nelson, M. E., Gadoury, D. M., Gevens, A. J., y Hausbeck M. K. (2015). “Powdery Mildew.” In *Field Guide for Integrated Pest Management in Hops*, 3rd Ed., edited by S. D. O’Neal, D. B. Walsh, and D. H. Gent. Yakima, WA: US Hop Industry Plant Protection Committee.
- George EF (1993) *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Ltd., Basingstoke, UK
- Gray, D.J., Compton, M.E., Harrell, R.C., y Cantliffe, D.J. (1995). Somatic embryogenesis and the technology of synthetic seed. In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol 30. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I. Springer, Berlin, pp. 127–151.
- Gurriarán, M. J., Revilla, M. A., y Tamés, R. S. (1999). Adventitious shoot regeneration in cultures of *Humulus lupulus* L. (hop) cvs. Brewers Gold and Nugget. *Plant Cell Reports*, 18(12), 1007–1011. <https://doi.org/10.1007/s002990050699>

- Haberlandt G (1902) Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber K. Akad Wiss Wien Math-naturw Classe 61: 1–23
- Haberlandt G. (1902) Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitz. ber. Akad. Wiss. Wien, math.-naturwiss. Kl. 3: 69-92
- Hasan SMZ y Takagi H (1995) Alginate-coated nodal segments of yam (*Dioscorea* spp) for germplasm exchange and distribution. *Plant Genet Resource News* 103:32–35
- Hiller, S.; Gingrich, G.; y Haunold, A. (2019). Growing Hops at Home. Cornell Cooperative Extension. Madison County. <http://madisoncountycce.org/agriculture/hops-program/growing-hops-at-home>
- Hirakawa, T., y Tanno, S. (2022). *In Vitro* Propagation of *Humulus lupulus* through the Induction of Axillary Bud Development. *Plants*, 11(8), 1066.
- Horlemann, C., Schwekendiek, A., Höhnle, M., y Weber, G. (2003). Regeneration and Agrobacterium-mediated transformation of hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Cell Reports*, 22(3), 210–217. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0676-8>
- Jara, G y Seemann, P. (2007). Manual de Procedimientos y Técnicas, Uso de Equipos e Instrumentos de Laboratorio. *Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales*, UACH, Valdivia. 60p.
- Jiménez E. (1998) Cultivo de ápices y meristemas. En J. Pérez (Ed.), *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología* (pp. 45-56). Cuba. Ediciones GEO
- Keller, E. J., Senula, A., Leunufna, S., y Grube, M. (2006). Slow growth storage and cryopreservation tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections. *International Journal of Refrigeration*, 29(3), 411-417.
- Khan, M. I., Ahmad, N., Anis, M., Alatar, A. A., y Faisal, M. (2018). *In vitro* conservation strategies for the Indian willow (*Salix tetrasperma* Roxb.), a vulnerable tree species via propagation through synthetic seeds. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 17-21.
- Kneen, R. (2003). Small Scale and Organic Hops Production. Left Fields, British Columbia. <http://cesonoma.ucanr.edu/files/238645.pdf>

- Krikorian, A. D. (1995). Hormones in tissue culture and micropropagation. *In Plant hormones* (pp. 774-796). Springer, Dordrecht
- Lata, H., Chandra, S., Khan, I.A., ElSohly, M.A., (2009). Propagation through alginate encapsulation of axillary buds of *Cannabis sativa* L. -an important medicinal plant. *Physiol. Mol. Boil. Plant* 15, 79–86. <https://doi.org/10.1007/s12298-009-0008-8>.
- Liberatore, C. M., Rodolfi, M., Beghè, D., Fabbri, A., Ganino, T., y Chiancone, B. (2020). Adventitious shoot organogenesis and encapsulation technology in hop (*Humulus lupulus* L.). *Scientia Horticulturae*, 270. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109416>
- López R. (2007) Micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunth en medio sólido y por inmersión temporal, y estudio de su desarrollo en campo. Trabajo de Grado Magíster. Universidad del Quindío, Universidad Tecnológica, Universidad de Caldas. Armenia, Colombia. 2007. 99 pp.
- Machado, J. C., Faria, M. A., y Ferreira, I. M. (2019). Hops: New Perspectives for an Old Beer Ingredient. *In Natural Beverages*. Elsevier Inc. (pp. 267-301). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816689-5.00010-9>
- Mafakheri, M., y Hamidoghli, Y. (2015). Micropropagation of hop (*Humulus lupulus* L.) via shoot tip and node culture. *In IV International Humulus Symposium 1236* (pp. 31-36).
- Magadan M.; Valladares Alonso, J.; Pinero Andion, J.; Fernández Paz, J.; García Pedreira, J.; Olmedo Nadal, J. (2011). Guía del cultivo del lúpulo. Lúpulo Tecnología de Galicia, Sociedad Cooperativa Gallega (LU.TE.GA). <http://www.lutega.com/pdf/guiacultivo.pdf>
- Martínez Dodda, J. (2021, 4 de abril). El lúpulo, el motorcito que pone a El Bolsón en la mira del mundo. Clarín Rural. Consultado el 30 de septiembre de 2021. https://www.clarin.com/rural/lupulo-motorcito-pone-bolson-mira-mundo_0_B4XPkWCoM.html
- Martínez, D., Tamés, R. S., y Revilla, M. A. (1999). Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot-tips of hop (*Humulus lupulus* L.) using encapsulation/dehydration. *Plant Cell Reports*, 19(1), 59–63. <https://doi.org/10.1007/s002990050710>

- Marulanda M.L., López A.M. Uribe M., y Gutiérrez L.G. (2010) Biodiversidad y Biotecnología de la *Guadua angustifolia* Kunth. Editorial Publiprint Ltda. Dosquebradas, Colombia. 2010. 106 pp.
- Mccormack, E.; Velasquez, L.; Delk, N.; y Braam, J. (2006). Touch Responsive Behaviors and Gene Expression in Plants. *Communication in plants*. <http://bioc.rice.edu/~braam/pubs/McCormack.2006.cpy.pdf>
- Melnychuk, M; Boyko, A; Grygoruk, I; Makatenko, N; Golub, G; Overchenko, V; Likhanov, A; Kliuvadenko, A; Pilipchuk, E; y Shulga, V. (2013). Biotechnological approach for *in vitro* cloning of virus-free hops (*Humulus lupulus* L.) and formation of organic hop gardens in the Ukraine. National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. *International Hop grower convention: Proceedings of the scientific commission. Session II: Biotechnology*: 32 – 35.
- Monteuuis, O., y Bon, M.-C. (2000). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 63(3), 173–177. doi:10.1023/a:1010611126950:
- Morton, G. (2013). Nova Scotia Hop Growers' Guide 2013. Annapolis Digby Economic Development Agency. Nova Scotia. Canada. <https://novascotia.ca/thinkfarm/documents/hop-grower-guide2013.pdf>
- Mroginski, L. A., y Roca, W. M. (1991). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. *Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)*. Cali, Colombia, 19-40.
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Musi Saluj (2022a). Información agroclimatológica del valle inferior del río Negro (Año 2021). INTA. https://inta.gob.ar/sites/default/files/datos_climaticos_del_valle_inferior_del_rio_negro_ano_2021_0.pdf
- Musi Saluj (2022b). Información agroclimatológica del valle inferior del río Negro (Año 4 - Nº 2 – Febrero 2022). INTA. https://inta.gob.ar/sites/default/files/02-2022_eea_valle_inferior.pdf

- Navarro-Ureña, J. A. (2002). Encapsulamiento de meristemas de papa (*Solanum tuberosum*) para la crioconservación y la propagación en invernadero.
- Nievas, W. E., Villarreal, P., Rosati, A., Rodriguez, A. B., y Lago, J. (2021). *El cultivo del lúpulo. Aspectos agroambientales y económicos para el Alto Valle del río Negro*. Ediciones INTA.
- Nieves N, Lorenzo JC, Blanco MA, Gonzalez J, Peralta H, Hernandez M, Santos R, Concepcion O, Borroto CG, Borroto E, Tapia R, Martinez MF, y Fundora Gonzalez A (1998) Artificial endosperm of Cleopatra tangerine zygotic embryos: a model for somatic embryo encapsulation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 54:77–83
- Oladokuna, O., Tarrega, A., James, S. y Cook, D. (2016). The impact of hop bitter acid and polyphenol profiles on the perceived bitterness of beer. *Food Chemistry* 205: 212–220.
- Olmos, S, Luciani, G. y Galdeano, E. (2004). Micropropagación. En: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. (Echenique, V., Rubinstein, C., Mroginski, L. eds.). Ediciones INTA. pag. 163-358.
- Pattnaik S, y Chand PK (2000) Morphogenic response of the alginate-encapsulated axillary buds from *in vitro* cultures of six mulberries. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 60:177–2000
- Peredo, E. L., Arroyo-García, R., Reed, B. M., y Revilla, M. Á. (2008). Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and cold-stored hops (*Humulus lupulus* L.). *Cryobiology*, 57(3), 234-241.
- Perez Molphe, E.; Ramírez, M. R.; Gordon, N. H, y Ochoa, A. N. (1999). Introducción al cultivo de tejidos vegetales. *Univ. Autónoma de Aguascalientes*. México: 180 pp
- Radice S. (2004). Morfogénesis *in vitro*. En: *Biotecnología y mejoramiento vegetal*. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Editores: Dra. Viviana Echenique, Dra. Clara Rubinstein, Ing. Agr. Luis Mroginski. Parte II, Capitulo I, pp 26-33
- Raiser, T. C. (2011) Commercial aspects of hops, Lecture presented at the 1st Hops Academy, Nürnberg, Germany.
- Ray, A., y Bhattacharya, S. (2008). Regeneration of genetically uniform *Boerhaavia diffusa* by culture of nodal explants and synthetic seeds. *Int. Jr. Plant Ded. Biol*, 2, 123-127.

- Redenbaugh, K., (1993). Introduction. In: Redenbaugh, K. (Ed.), *Synseeds: Applications Ofsynthetic Seeds to Crop. Improvement*. CRC, Boca Raton, Fla, pp. 3–7.
- Resmi, L., y Nair, A. S. (2011). Differential effect of cytokinins in the micropropagation of diploid and triploid Musa cultivars. *International Journal of Integrative Biology*, 11(1), 35-38.
- Rizzi, M. y Tarazzi, N. (2018). *Producción de cerveza artesanal reemplazando pellets por flor de lúpulo variedad cascade en la ciudad de Córdoba*. [Trabajo final, Universidad Nacional de Córdoba - Facultad de Ciencias Agrarias]. <https://rdu.unc.edu.ar/handle/11086/11620>
- Roy, A. T., Leggett, G., y Koutoulis, A. (2001). Development of a shoot multiplication system for hop (*Humulus lupulus* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 37(1), 79-83. <https://doi.org/10.1079/IVP2000104>
- Ruth, P. (2018). Evaluation of the properties of finnish hops. Hameen Ammattikorkeakoulu. Hame University Applied Science. https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/147440/Ruth_Paul.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Sarkar D, y Naik PS (1997) Synseeds in potato: an investigation using nutrient-encapsulated *in vitro* nodal cutting segments. *Sci Hortic* 73:179–184
- Segura J. (2008). Introducción al desarrollo. Concepto de hormona vegetal. En Azcon J, Talon M, editores. *Fundamentos de fisiología vegetal*. Barcelona (España): McGraw-Hill. (2da ed., p. 349-376).
- Sharma TS, Singh BM, y Chauban RS (1994) Production of diseasefree encapsulated buds of Zingiber officinale Rosc. *Plant Cell Rep* 13:300–302
- Sharma, S., Shahzad, A., y da Silva, J. A. T. (2013). Synseed technology—a complete synthesis. *Biotechnology Advances*, 31(2), 186-207.
- Sharry, S., Adema, M., y Abedini, W. (2015). Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Editorial de la Universidad de La Plata. Argentina.

- Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de plagas (SINAVIMO). (s.f). *Humulus lupulus*. <https://www.sinavimo.gob.ar/cultivo/humulus-lupulus>
- Sirrine, R.; Rothwell, N.; Goldy, R.; Marquie, S.; y Brown-Rytlewski, D. (2010). Sustainable Hop Production in the Great Lakes Region. MSU. Michigan State University Extension. Extension Bulletin E-3083. New. January 2010. <https://www.uvm.edu/sites/default/files/media/Sirrine-Sustainable-Hop-Production-in-the-Great-Lakes-Region.pdf>
- Sisaro, D., y Hagiwara, J. C. (2016). Propagación vegetativa por medio de estacas de tallo. *Ediciones INTA*: 1ra Edición.
- Skirvin, R. Motoike, S. Norton, M. Ozgur, M. Al-Juboory, y K. McMeans, O. (1999). Workshop on micropropagation, establishment of contaminant-free perennial plants *in vitro*. *In Vitro Cell. Dev Biol.-Plant*. 35: 296-298
- Skoog, F., y Miller, C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11: 118-131.
- Soneji JR, Rao PS, y Mhatre M (2002) Germination of synthetic seeds of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). *Plant Cell Rep* 20:891–894
- Standardi A, y Piccioni E (1998). Recent perspective on synthetic seed technology using nonembryonic *in vitro*-derived explants. *Int J Plant Sci* 159:968–978
- Standardi, A., Micheli, M., (2013). Encapsulation of *in vitro*-derived explants: an innovative tool for nurseries. In: Lambardi, M., Ozudogru, E.A., Jain, S.M. (Eds.), *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants*. Springer, New York, (pp. 397–418). https://doi.org/10.1007/978-1-62703-074-8_31.
- Su, Y. H., Liu, Y. B., y Zhang, X. S. (2011). Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant*, 4(4), 616-625. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr007>
- Svoboda, P. (1992) Cultivation of isolated hop tips (*Humulus lupulus* L.) *in vitro*. *Rostlinná Výroba. Plant soil and environment* 38 (6): 523-528 <https://www.researchgate.net/publication/266396281>

- Tabares, E., Pachón, J., y Roca, W. M. (1991). Variación somaclonal y su aplicación al mejoramiento de cultivos. Cultivo de tejidos en la agricultura. W. Roca y L. Mroginski (eds). *Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Colombia*.
- Tokin, B.P. (1964) .Regeneration and somatic embryogenesis. In Regeneration and wound-healing- Symp. biol.hung.III., p.11-45.
- Torrey, J.G. (1966). The initiation of organized development in plants. *Adv. Morphog* 5:39-91.
- Trigiano, R. N., y Gray, D. J. (2016). *Plant tissue culture, development, and biotechnology*. CRC Press.
- Verzele, M., and Keukeleire, D. D. (1991) Chemistry and Analysis of Hop and Beer Bitter Acids, Vol. 27, Elsevier: Amsterdam.
- Villarreal, B. (2015). ¿Cómo se forman las nuevas plantas *in vitro*? - Morfogénesis *in vitro*. Organogénesis. Embriogénesis somática. En Sandra Sharry, Marina Adema, Walter Abedini (Eds.), *Plantas de probeta* (92-97 pp.). Editorial de la Universidad de La Plata.
- Vine, S. J. y Jones, O. P. (1969). The culture of shoot tips of hop (*Humulus lupulus* L.) to eliminate viruses. *J. hort. Sci.*, 44, 281-4.
- West, T. P., Ravindra, M. B., y Preece, J. E. (2006). Encapsulation, cold storage, and growth of *Hibiscus moscheutos* nodal segments. *Plant cell, tissue and organ culture*, 87(3), 223-231.
- Wetmore, R. H. y Sorokin, S. (1955). On the differentiation of xylem. *Journal of the Arnold Arboretum*, 36, 305-17.
- Wirowski, Z. y Socha Z. (1991). Attempts to improve the clonal propagation of hop using the method of tissue culture (in Polish). *Pam. Pul.* 98: 145-153.
- Woodward, B.(1997). Micropropagation. En: Advanced tissue culture course. UNESCO/BAC BETCEN, Biotechnology Division ACR- Roodeplaat. Pretoria. p. 186.
- Ziv, M. (1995). *In vitro* acclimatization. *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*, 493–516. doi:10.1007/978-94-015-8461-6_20

ANEXOS

Anexo 1

Investigaciones realizadas de lúpulo (<i>Humulus lupulus</i>)				
Autor/es y año	Título	Objetivo	Explante/s utilizado/s	Resultados
A. N. Adams (1975)	Elimination of viruses from the hop (<i>Humulus lupulus</i>) by heat therapy and meristem culture	Encontrar una técnica confiable para cultivar plantas de lúpulo a partir de pequeños explantes para la eliminación rutinaria de los virus HLV, NRSV y HMV.	Meristemas	<ul style="list-style-type: none"> - BAP 0,2 ppm y cultivo a 25°C mayor longitud de brotes. - AG₃ no es invariablemente requerido. - El mejor enraizamiento fue con 2 ppm de IBA y 0,1 ppm de 2,4-D. - Para la eliminación del virus NRSV es necesaria la terapia térmica. Los virus HLV y HMV se eliminan en gran proporción con el cultivo de meristemas.
M.J. Gurriarán; M.A. Revilla; R.S. Tamés (1999)	Adventitious shoot regeneration in cultures of <i>Humulus lupulus</i> L. (hop) cvs. Brewers Gold and Nugget	Establecer un protocolo eficiente para la regeneración de plantas a partir de callos. Estudiar regeneración directa e indirecta de dos variedades de lúpulo: Nugget y Brewers Gold	Secciones nodales Secciones internodales	<ul style="list-style-type: none"> - Todas las combinaciones hormonales ensayadas promovieron la formación de callos después de 30 días en los segmentos internodales de Nugget y Brewers Gold. - Los mayores porcentajes de explantes enraizados se observaron cuando se adicionó IBA 4,99 µM al medio con citoquinina, donde casi la mitad de los explantes presentaron raíces. Las raíces emergieron directamente de los explantes o del callo formado. - La regeneración directa de brotes sólo se observó en segmentos internodales cultivados en medios con BAP o zeatina sola, aunque a tasas muy bajas.

TFG: Evaluación del cultivo *in vitro* de variedades nacionales de lúpulo (*Humulus lupulus*) como una alternativa a la propagación agámica tradicional

<p>D. Martínez; R.S. Tamés; M.A. Revilla (1999)</p>	<p>Cryopreservation of <i>in vitro</i>-grown shoot-tips of hop (<i>Humulus lupulus</i> L.) using encapsulation/dehydration</p>	<p>Desarrollar un método de encapsulación/deshidratación para la crioconservación de ápices de lúpulo <i>in vitro</i>.</p>	<p>Segmentos nodales</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Los ápices encapsulados mostraron una tasa de supervivencia del 95-100 % y la posterior regeneración de los brotes. - Los nuevos brotes emergieron directamente de la cúpula apical en el medio de multiplicación (Adams, 1975), sin formación de callos; a veces se produjo una pequeña proliferación en la base de la punta del brote. - El enraizamiento se produjo en el mismo medio de multiplicación después de otros 30 a 40 días.
<p>Roy, Ashis Taru; Leggett, Grey; Koutoulis, Anthony (2001)</p>	<p>Development of a shoot multiplication system for hop (<i>Humulus Lupulus</i> L.)</p>	<p>Investigar la respuesta <i>in vitro</i> del lúpulo a TDZ y describir un protocolo para la regeneración exitosa del lúpulo.</p>	<p>Segmentos nodales</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Para micropropagar la variedad de lúpulo H138, los cultivos: (i) se establecieron en MS con 0,57 μM de IAA y 2,22 μM de BA; (ii) multiplicado en MS con IAA 0,57 μM y TDZ 2,27 μM; (iii) elongados en MS; y (iv) enraizados en MS de potencia media con IAA 5,71 μM y IBA 4,9 μM. - Como TDZ induce la multiplicación de brotes de alta frecuencia en el lúpulo, debe considerarse un componente integral en la producción de una gran cantidad de clones élite para la comercialización.

<p>C. Horlemann; A. Schwekendie k; M. Hhnle; G. Weber (2003)</p>	<p>Regeneration and <i>Agrobacterium</i>-mediated transformation of hop (<i>Humulus lupulus</i> L.)</p>	<p>Establecer un método eficiente de regeneración y transformación para la variedad de lúpulo "Tettninger"</p>	<p>Segmentos nodales, entrenudos de brotes, pecíolos y secciones de hojas</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Se observó organogénesis espontánea a partir de tallos con una frecuencia de aproximadamente 0,05–0,1%. - Los entrenudos de brotes resultaron los explantes más adecuados para el fin en cuestión. - Los explantes del invernadero no se desarrollaron más allá de los callos. Por el contrario, los explantes de plantas propagadas <i>in vitro</i> se regeneraron en todos los medios investigados. - La mayor tasa de regeneración directa se obtuvo en el medio con IAA 1,43 μM y TDZ 9,08 μM. - En la etapa de transformación, la concentración de kanamicina seleccionada fue de 25 mg/l. - El 5,7% de los grupos organogénicos crecieron bajo selección con kanamicina. Se identificaron 2,9% de plantas positivas para GUS y 1,5% se pudieron entrenar con éxito en el invernadero.
--	---	--	---	--

<p>Claudia Maria Liberatore; Margherita Rodolfi; Deborah Beghè; Andrea Fabbri; Tommaso Ganino; Benedetta Chiancone (2020)</p>	<p>Adventitious shoot organogenesis and encapsulation technology in hop (<i>Humulus lupulus</i> L.)</p>	<p>Mejorar la propagación <i>in vitro</i> del lúpulo, recurriendo a la regeneración del pecíolo y del entrenudo y estudiar la tecnología de encapsulación en esta especie.</p>	<p>Pecíolo y entrenudos (para cultivo <i>in vitro</i>) Microestacas (para encapsulación)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - La formación de callos fue la primera respuesta observada en los explantes cultivados. - Se observó rizogénesis, luego de una semana de cultivo, a partir de entrenudos y, luego de dos semanas de cultivo, a partir de pecíolos. - En su mayoría, se observó organogénesis indirecta. <ul style="list-style-type: none"> - En general, en la encapsulación, la conversión fue alta para todos los explantes. - El número de raíces producidas por cada explante fue muy variable, tanto en el cultivo <i>in vitro</i> inicial como en la encapsulación, dependiendo, principalmente, de la concentración de BAP.
---	---	--	--	--

Anexo 2

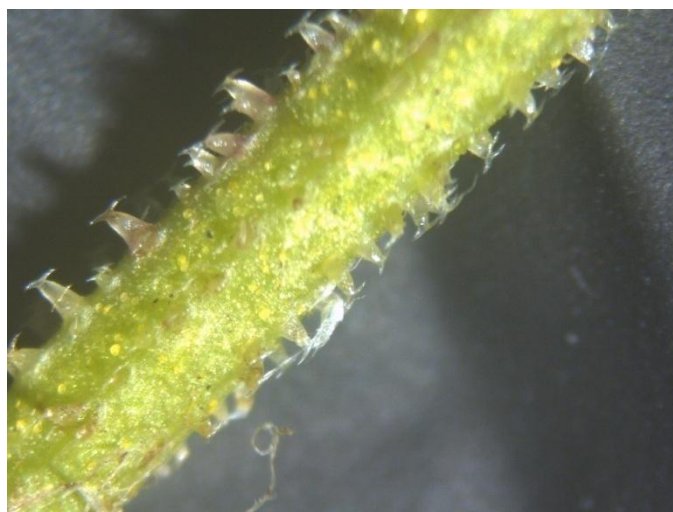


Figura 1 - Anexo 2. Típicos tricomas peltados presentes en el tallo de lúpulo (*Humulus lupulus*)

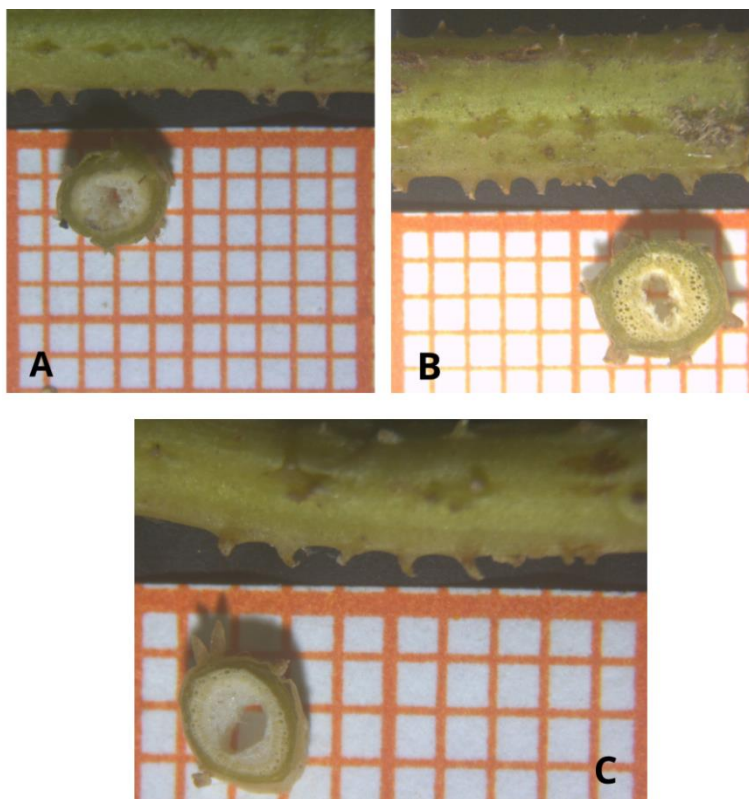


Figura 2 - Anexo 2. Conteo de tricomas presentes en 1 cm. de tallo de las variedades evaluadas
A) Nahuel B) Mapuche C) Trafal

Anexo 3

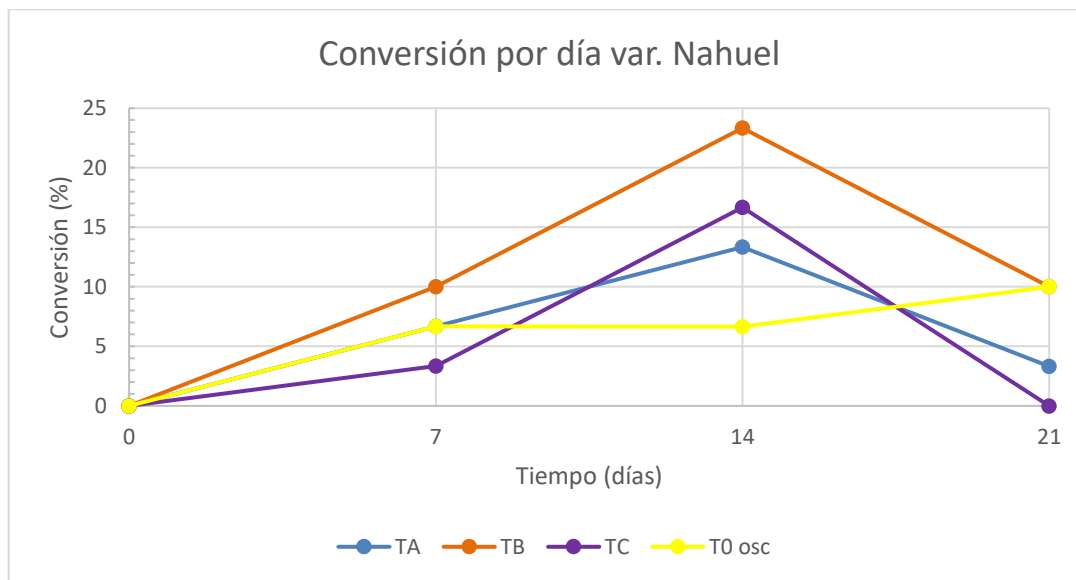


Gráfico A. Conversión por día var. *nahuel*

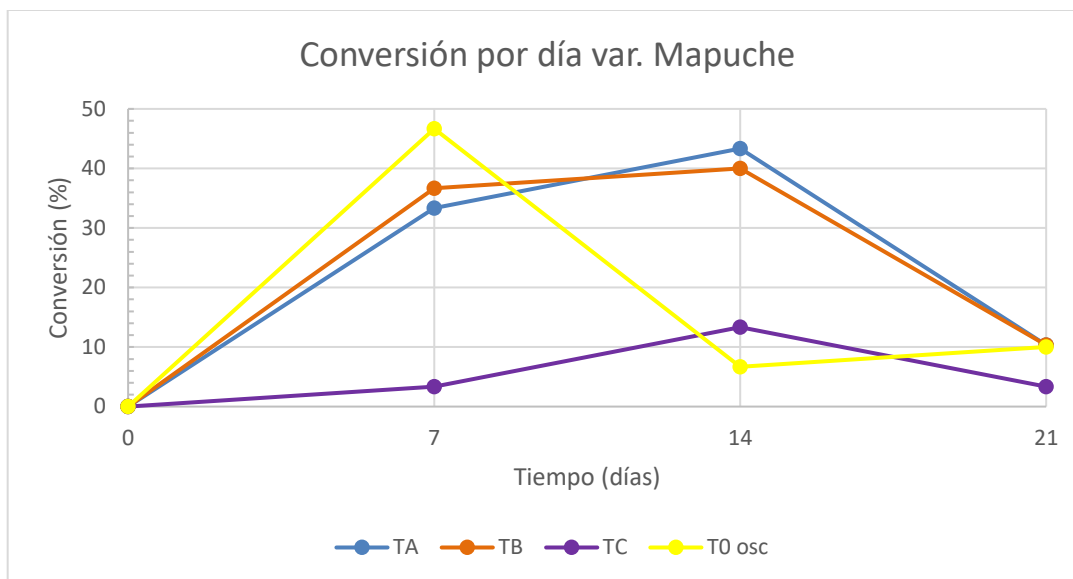


Gráfico B. Conversión por día var. *mapuche*

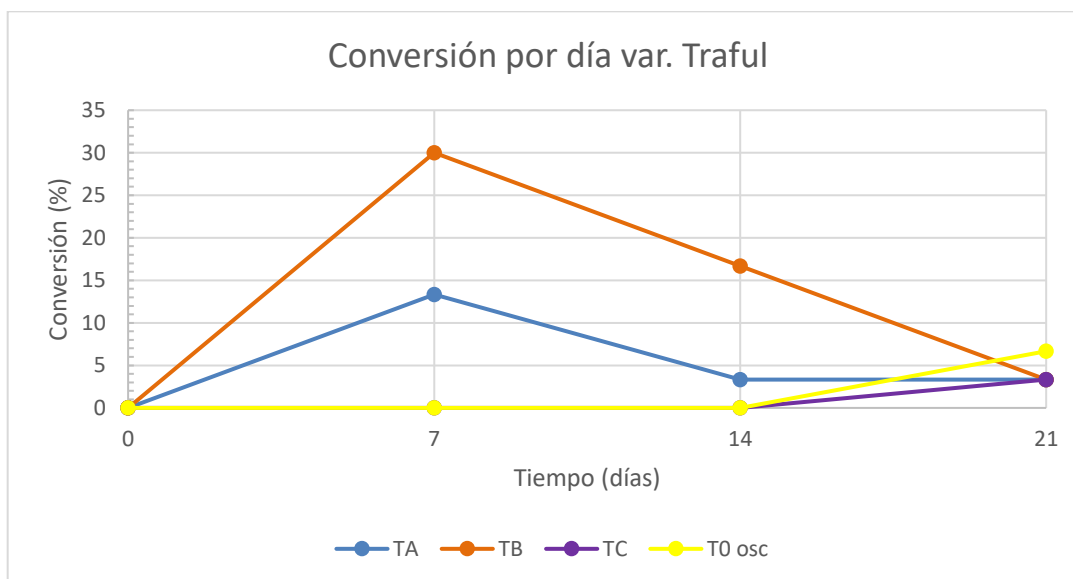


Gráfico C. Conversión por día var. *traful*