

SEMILLAS SINTÉTICAS: UNA ESTRATEGIA PARA LA CONSERVACIÓN DE LÚPULO (*HUMULUS LUPULUS* L.)

Luciana Di Sario^{1,2*}, María Fany Zubillaga^{1,2}, Sandra Elizabeth Sharry^{1,3} y Patricia A. Boeri^{1,2}

RESUMEN

El lúpulo (*Humulus lupulus* L.) es una especie herbácea de gran interés para la industria cervecera, que tradicionalmente se propaga de forma asexual, a través de rizomas o esquejes nodales, dado que sólo se utilizan las inflorescencias femeninas (conos). No obstante, ello constituye una desventaja en términos productivos y de calidad fitosanitaria, debido a que estas prácticas, sostenidas en el tiempo, favorecen la dispersión y acumulación de infecciones virales y fúngicas. En Argentina, el cultivo de lúpulo es escaso y poco diversificado, lo que conlleva a que actualmente, las demandas y necesidades del mercado nacional no se encuentren satisfechas. Al respecto, las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, entre las que se encuentra la producción de semillas sintéticas, contribuyen positiva y significativamente en los programas de conservación y multiplicación a gran escala de material vegetal de óptima calidad sanitaria. En este sentido, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar diferentes condiciones de conservación de semillas sintéticas de lúpulo de la variedad nacional “Mapuche”, con el fin de contribuir a la estandarización de esta técnica y su posterior implementación en distintas variedades de lúpulo. Para ello, explantes meristemáticos procedentes de material vegetal de campo fueron encapsulados en una solución de alginato de sodio y cloruro de calcio, para la obtención de las semillas sintéticas. Posteriormente, se evaluó la conversión de estas bajo condiciones controladas de luz y temperatura

¹ Universidad Nacional de Río Negro, Sede Atlántica. * ldisario@unrn.edu.ar

² Centro de Investigación y Transferencia (CIT- Río Negro-CONICET).

³ Laboratorio de investigaciones en madera (LIMAD), Fac. Cs. Agrarias y Forestales, UNLP.

(16 h luz, $21 \pm 2^\circ\text{C}$), luego de un periodo de almacenamiento a 4°C , durante una, dos y tres semanas en un medio basal de Murashige y Skoog, a la mitad de la concentración original. Para la conversión, este medio fue suplementado con citocininas y giberelinas. Los resultados indicaron que si bien es posible la utilización de semillas sintéticas de *Humulus lupulus* var. *mapuche* a bajas temperaturas (4°C) para establecer programas de conservación *ex situ*, es importante considerar que el periodo de almacenamiento de estas no debe exceder las tres semanas bajo dichas condiciones.

PALABRAS CLAVE

Cultivo de tejidos vegetales, micropropagación *in vitro*, encapsulamiento, meristemas.

Introducción

Lúpulo: características y usos

El lúpulo (*Humulus lupulus* L.) es una especie herbácea de la familia *Cannabaceae*, anual en su parte aérea y perenne en su parte subterránea, que presenta una vida útil de 12 a 15 años. Habitualmente se cultiva entre las latitudes de 35° y 55° de ambos hemisferios, donde el fotoperíodo en la época estival es mayor respecto a otras regiones geográficas, y las temperaturas oscilan entre 16°C y 18°C , condiciones que favorecen su desarrollo fenológico (Doods, 2017; Nievas *et al.*, 2021). Durante la etapa otoño-invernal sólo prevalecen los rizomas, que son empleados tradicionalmente para la reproducción asexual o agámica. Durante el período primavera-estival se reactiva la fase vegetativa con la aparición de nuevos brotes desde los rizomas que crecen notoriamente hasta alcanzar una altura máxima de hasta 6 metros (30 cm por día), con una rápida aparición hojas (Kneen, 2003; Nievas *et al.*, 2021). Luego, cuando la duración del día comienza a disminuir, se induce la etapa reproductiva y se observan las primeras inflorescencias (Sirrinc, 2010; Hiller, 2019). Al tratarse de una especie dioica, las inflorescencias femeninas y masculinas se disponen en las ramas laterales de diferentes pies.

El interés de este cultivo se concentra en las plantas femeninas debido a que estas producen inflorescencias (conos), ampliamente utilizadas en la industria cervecera, y en menor medida, en la farmacéutica. Los conos se caracterizan por presentar glándulas que producen lupulina, un polvo amarillo resinoso compuesto de metabolitos secundarios, entre los que se encuentran ácidos amargos, aceites esenciales y taninos, que aportan a diferentes aspectos durante la elaboración de la cerveza y constituyen la principal materia prima para el aporte de sabor y/o amargor en esta bebida (Machado *et al.*, 2019).

Cultivo nacional e internacional

La producción mundial de conos se estima en 129 000 toneladas anuales sobre una superficie total de aproximadamente 60 000 hectáreas, concentradas principalmente en Alemania y Estados Unidos (Machado *et al.*, 2019; Martínez Dodda, 2021). En Argentina, el cultivo se reduce a 189 hectáreas, localizadas principalmente en la Comarca Andina del Paralelo 42, que incluye localidades de las provincias de Río Negro y Chubut. La producción promedio es de 300 toneladas al año; no obstante, esta sólo cubre el 22% de la demanda nacional, lo que conlleva a la necesidad de importar materia prima (conos y pellets) por parte de los consumidores (Cámara de la Industria Cervecera Argentina, 2020; Martínez Dodda, 2021). Esta situación se profundiza frente a una escasa oferta de variedades liberadas, muchas de las cuales han quedado obsoletas frente a las nuevas necesidades del sector, que demanda incorporar otros perfiles organolépticos distintivos, ofrecidos por el mercado internacional. Esta escasa oferta varietal, en cantidad y calidad, constituye una problemática para la industria nacional y latinoamericana. En este sentido, en Argentina, la mayor parte de la superficie productiva corresponde a variedades importadas, que relegan el cultivo de otros materiales de origen nacional, como es el caso de la variedad “Mapuche”, destacada por su alto contenido de aceite total.

Métodos de propagación

La demanda comercial concentrada en las plantas femeninas restringe el empleo de semillas para la reproducción de este cultivo. Por ello, tradicionalmente, el lúpulo se propaga de forma asexual mediante rizomas o esquejes nodales, de manera simple y económica (Fragó *et al.*, 2009; Agehara *et al.*, 2020). No obstante, estas formas de propagación presentan desventajas asociadas a la sanidad de las plantas, ya que la reproducción agámica, sostenida en el tiempo, favorece la dispersión y acumulación de infecciones virales y fúngicas (Agehara *et al.*, 2020). En este contexto, las herramientas biotecnológicas, como el cultivo de tejidos vegetales (CTV) y sus diversas técnicas, desempeñan un papel positivo y significativo en los programas de conservación y multiplicación a gran escala de material vegetal de alta calidad sanitaria.

La propagación *in vitro* de lúpulo es factible y es un aspecto clave como una alternativa a la propagación tradicional. Además de las secciones nodales, existen antecedentes del empleo de otros tipos de explantes como brotes adventicios, pecíolos, secciones internodales, e incluso meristemas, para su regeneración (Fragó *et al.*, 2009). En los últimos años, el cultivo de meristemas se ha convertido en la principal técnica para la multiplicación vía organogénesis, dado que es posible generar plantas completas, inducir la formación de brotes laterales, establecer estrategias de conservación de germoplasma, preservar las características genéticas de la planta madre, y eliminar patógenos de los cultivos, especialmente virus (Echenique *et al.*, 2004; Fragó *et al.*, 2009).

Semillas sintéticas (SS)

Una de las finalidades del cultivo *in vitro* es obtener semillas sintéticas (SS), especialmente cuando se trabaja con material vegetal de alto valor o con el objetivo de conservarlo. Inicialmente, la producción de SS incluía la encapsulación de embriones somáticos; sin embargo, en los últimos años, la técnica se ha extendido a la encapsulación de otros

explantes con capacidad de convertirse en plantas completas, como brotes apicales o axilares, segmentos de raíces y otros derivados del cultivo *in vitro*. Generalmente, los propágulos se encapsulan en gotas de alginato de sodio al 2% que, según las necesidades, puede complementarse con soluciones específicas como antioxidantes o medios nutritivos (Sharma *et al.*, 2013). Esta matriz que recubre el explante actúa como un endosperma sintético, protege los micropropágulos, proporciona resistencia a la desecación y ejerce la presión mecánica necesaria para retenerlos dentro de la cápsula durante el almacenamiento, lo que facilita la conservación, el transporte, el intercambio de germoplasma, y la mecanización del proceso (Navarro Ureña, 2002; West *et al.*, 2006; Alatar y Faisal, 2012). Asimismo, el éxito de esta tecnología depende de otras variables como las condiciones ambientales durante el almacenamiento; por lo general, se utilizan temperaturas cercanas a los 4°C para cultivos de clima templado, y entre 10 y 15°C para aquellos de clima tropical (Keller *et al.*, 2006; Ray y Bhattacharya, 2008).

Metodología

Material vegetal

Durante el período estival, en la ciudad de Viedma, Río Negro, Argentina, se recolectaron secciones caulinares de lúpulo, de al menos 4 nudos, de la variedad “Mapuche”. Para la desinfección, estas se cortaron en secciones uninodales de aproximadamente 5 cm de longitud, y luego se sumergieron en una solución de etanol 70% v/v durante 5 minutos, en agitación constante. Luego, el material se colocó en una solución de hipoclorito de sodio comercial (35 gCl/l) al 10% v/v, con Tween 20®, por un periodo de 20 minutos. Finalmente, se realizaron tres lavados consecutivos con agua destilada estéril. Una vez desinfectado el material, se seleccionaron, bajo lupa binocular y en condiciones de esterilidad, los explantes iniciales que consistieron en secciones meristemáticas con al menos dos primordios foliares.

Obtención de semillas sintéticas

Los explantes meristemáticos, fueron encapsulados en una matriz de alginato de sodio al 2% (p/v), previamente esterilizada, y recogidos en gotas con una micropipeta. Posteriormente, se dispusieron por un periodo de 3 a 5 minutos, en una solución de cloruro de calcio (CaCl_2) 100 mM, en agitación constante. Finalmente, las SS obtenidas fueron colocadas sobre papel tissue estéril para eliminar el exceso de CaCl_2 . A fin de evaluar la respuesta a la conservación a corto plazo de los explantes meristemáticos encapsulados, se realizaron tres tratamientos, cada uno de los cuales constó de tres repeticiones de 10 SS ($n=10$). En este sentido, se analizó la respuesta de las SS luego de una, dos y tres semanas de almacenamiento a 4°C en oscuridad (TA, TB y TC, respectivamente), previo a su cultivo en condiciones controladas de luz y temperatura (16 hs luz, $21 \pm 2^\circ\text{C}$). Asimismo, se realizó un control (T0) para cada tratamiento, que consistió en la incubación de las SS a $21 \pm 2^\circ\text{C}$, en oscuridad (1, 2 y 3 semanas). El medio de cultivo utilizado durante el almacenamiento en frío fue el de Murashige y Skoog (1962), a la mitad de la concentración original. Mientras que para la conversión de las SS se empleó el mismo medio basal suplementado con BAP (6-bencilaminopurina) 0,0002 g/L, y AG3 (ácido giberélico) 0,001 g/L. Luego de 7, 14 y 21 días, se observó la formación de raíces y el porcentaje de conversión de las SS, es decir, cuando éstas estas produjeron la ruptura de la matriz de encapsulamiento por la aparición de brotes (Ray & Bhattacharya, 2008).

Resultados y discusión

Desinfección

El protocolo de desinfección adoptado en este trabajo para el posterior aislamiento de los meristemas fue exitoso, dado que el 100% de los explantes resultaron libres de contaminación, respuesta que pudo verse favorecida por las características axénicas propias del tejido meristemático. 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 incluyó un tratamiento con etanol y luego con hipoclorito de sodio en bajas concentraciones y tiempos reducidos.

Obtención de semillas sintéticas

Las SS obtenidas fueron capaces de germinar y convertirse en una planta completa bajo condiciones adecuadas, incluso luego de un periodo de almacenamiento a 4°C (Figura 1). Como se observa en la Figura 2, los tratamientos TA y TB produjeron un 90% de conversión, mientras que TC y el control en oscuridad (T0 osc) obtuvieron porcentajes significativamente menores (20% y 63%, respectivamente). El bajo porcentaje de conversión alcanzado, cuando las SS fueron almacenadas durante 3 semanas a 4°C (TC), indica que estas temperaturas en forma prolongadas pueden afectar la viabilidad de los explantes, conforme a lo señalado por Engelmann (1991). Por otra parte, estudios realizados por diversos autores han demostrado avances significativos en la producción de SS de este cultivo. Así, Martínez *et al.* (1999) lograron establecer un procedimiento para la crioconservación de la variedad “Nugget”, mediante la técnica de encapsulación/deshidratación de ápices obtenidos del cultivo *in vitro*. La tasa de supervivencia informada por estos autores fue del 95-100%, valores similares a los obtenidos en este estudio, en los tratamientos TA y TB, a pesar de las diferencias en el método de conservación y tipo de cápsula empleada. Por su parte, 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%). Cabe destacar que, en el presente trabajo con la variedad “Mapuche”, se obtuvieron valores de conversión similares a los informados en la bibliografía por los autores anteriormente referenciados, y ello se logró con metodologías más simples y económicas, como el encapsulamiento en alginato de

sodio al 2% (p/v), sin el agregado de otros compuestos en la matriz. Adicionalmente, sólo en el tratamiento en frío durante dos semanas (TB) se logró el enraizamiento exitoso de los brotes que emergieron de las SS, aún en ausencia de auxinas en el medio donde fueron cultivadas. En este caso, la formación de raíces fue del 10% y éstas se produjeron vía organogénesis directa (Figura 1E), es decir, sin la presencia de callo, resultado similar al observado por Martínez *et al.* (1999) en la variedad “Nugget”.

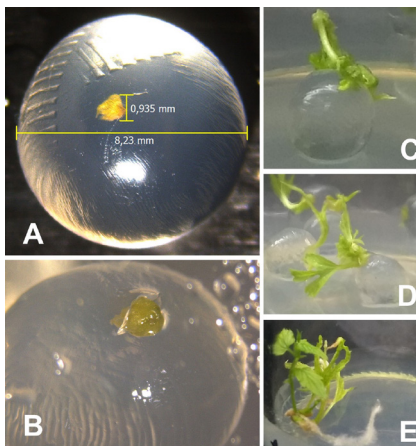


Figura 1. Semillas sintéticas de lúpulo var. “Mapuche”. A: dimensiones; B: rotura de la matriz por el explante; C: elongación del explante; E: enraizamiento

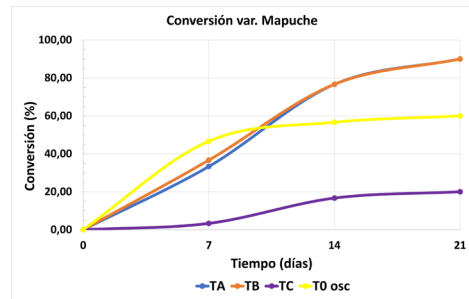


Figura 2. Porcentaje de conversión de semillas sintéticas en el tiempo

Conclusiones

Los resultados obtenidos indican que es posible aplicar la técnica de semillas sintéticas para el establecimiento de protocolos de propagación y conservación de lúpulo (*Humulus lupulus* L. var. *mapuche*), de manera eficiente y relativamente sencilla. No obstante, bajo las condiciones evaluadas, el almacenamiento en frío, a 4°C, no debe

superar las tres semanas, a fin de evitar daños en los tejidos, y afectar la conversión de las SS.

Por otra parte, se considera que la optimización de la técnica de SS generará un impacto positivo tanto en términos de conservación ex situ de esta especie, como en la mejora del transporte de material vegetal entre las regiones productoras, lo que permitiría la expansión del cultivo. Asimismo, las SS obtenidas a partir de meristemas podrían sustituir satisfactoriamente la propagación asexual por rizomas, y garantizar, de esta manera, la sanidad del material vegetal, particularmente en la variedad “Mapuche”, destacada por su empleo en el sector cervecero artesanal e incluso en cervezas premium.

Finalmente, cabe destacar que este trabajo constituye el primer reporte sobre la obtención de SS de la variedad de lúpulo “Mapuche”, de origen argentino. Asimismo, los resultados aquí obtenidos podrían generar oportunidades para incrementar la producción de este cultivo, lo cual influiría positivamente en la industria cervecera y a la investigación agrícola.

Agradecimientos

Se agradece a la Universidad Nacional de Río Negro, Sede Atlántica (Viedma), a Cervecería y Maltería Quilmes, y a la Asociación Civil de Cervecerías Artesanales de Viedma.

Referencias

- 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). <https://edis.ifas.ufl.edu/publication/HS1381>
- 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. <http://dx.doi.org/10.5897/JMPR11.1632>

- Cámara de la Industria Cervecera Argentina. (2020). *Agroindustria cervecera. Análisis de cadena de valor. FIEL – ABECEB*. <http://www.cervecerosargentinos.org/quienes-somos>
- 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-fornew-growers.pdf
- Echenique, V., Rubinstein, C., Mroginski, L., Levitus, G., & 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. <https://doi.org/10.1007/BF00039669>
- Faragó, J., Psenáková, I., & Faragová, N. (2009). The use of biotechnology in hop (*Humulus lupulus* L.) improvement. *Nova Biotechnologica*, 9(3), 279–293. <http://dx.doi.org/10.36547/nbc.1137>
- Hiller, S., Gingrich, G., & Haunold, A. (2019). *Growing Hops at Home. Cornell Cooperative Extension. Madison County*. <http://madisoncountycce.org/agriculture/hops-program/growing-hops-at-home>
- Keller, E. J., Senula, A., Leunufna, S., & Grübe, 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrefrig.2005.07.012>
- Kneen, R. (2003). *Small Scale and Organic Hops Production. Left Fields, British Columbia*. <http://cesonoma.ucanr.edu/files/238645.pdf>
- 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>
- Machado, J. C., Faria, M. A., y & Ferreira, I. M. (2019). Hops: New Perspectives for an Old Beer Ingredient. En A. Mihai Grumezescu & A. M. Holban (eds.) *Natural Beverages* (pp. 267-301). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816689-5.00010-9>
- 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., & 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>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Navarro-Ureña, J. A. (2002). *Encapsulamiento de meristemas de papa (Solanum tuberosum) para la crioconservación y la propagación en invernadero* [informe de bachillerato, Instituto Tecnológico de Costa Rica]. <https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/171/Práctica%20de%20especialidad%20.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Nievas, W. E., Villarreal, P., Rosati, A., Rodriguez, A. B., & Lago, J. (2021). *El cultivo del lúpulo. Aspectos agroambientales y económicos para el Alto Valle del río Negro*. Ediciones INTA.
- Ray, A., & Bhattacharya, S. (2008). Regeneration of genetically uniform *Boerhaavia diffusa* by culture of nodal explants and synthetic seeds. *International Journal of Plant Developmental Biology*, 2(2), 123-127. [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GS-BOOnline/images/0812/IJPDB_2\(2\)/IJPDB_2\(2\)123-127o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GS-BOOnline/images/0812/IJPDB_2(2)/IJPDB_2(2)123-127o.pdf)
- Sharma, S., Shahzad, A., & da Silva, J. A. T. (2013). Synseed technology—a complete synthesis. *Biotechnology Advances*, 31(2), 186-207. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.09.007>
- Sirrinc, R., Rothwell, N., Goldy, R., Marquie, S. & Brown-Rytlewski, D. (2010). *Sustainable Hop Production in the Great Lakes Region*. MSU. Michigan State University Extension. *Extension Bulletin E-3083*. <https://www.uvm.edu/sites/default/files/media/Sirrinc-Sustainable-Hop-Production-in-the-Great-Lakes-Region.pdf>
- 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>

West, T. P., Ravindra, M. B., & Preece, J. E. (2006). Encapsulation, cold storage, and growth of *Hibiscus moscheutos* nodal segments. *Plant cell, tissue and organ culture*, 87(3), 223-231. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-006-9155-6>