

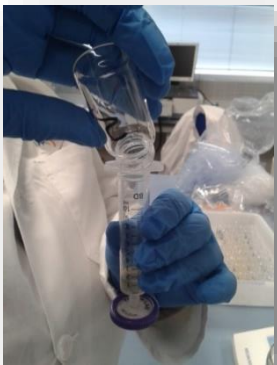


ETSIA

Escuela Técnica
Superior
de Ingeniería
Agronómica

Proceedings of the 7th WORKSHOP ON AGRI-FOOD RESEARCH

WIA:18



Universidad
Politécnica
de Cartagena

Proceedings of the 7th WORKSHOP ON AGRI-FOOD RESEARCH

∞
7
:
A
:
W
:
A



Acknowledgements

The Organizing Committee acknowledges the Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica -ETSIA- and the Institute of Plant Biotechnology -IBV- of the Universidad Politécnica de Cartagena – UPCT- their assistance in making possible this event. To Mare Nostrum Campus -CMN- the dissemination done. Funding received from the International Doctorate School of UPCT is also appreciated.

©2019 Programa de Doctorado en TAIDA

©2019, Universidad Politécnica de

Cartagena CRAI Biblioteca

Plaza del Hospital,1

30202 Cartagena

968325908

ediciones@upct.es



Primera edición, 2019

ISBN: 978-84-16325-89-4

Technical Editors / Organizing and Scientific Committee

Dr. Francisco Artés-Hernández (Convener)

Dr. Juan A. Fernández-Hernández

Dr. José Enrique Cos

Dr. Juan José Alarcón

Dr. Marcos Egea Gutiérrez-Cortines

Dra. Encarna Aguayo

Doctorate Program in Advanced Techniques for Research and Development in Food and Agriculture (TAIDA). Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica (ETSIA). Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT)

www.upct.es/estudios/doctorado/3470/



Esta obra está bajo una licencia de Reconocimiento-NO comercial-SinObraDerivada (by-nc-nd): no se permite el uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas. http://es.creativecommons.org/blog/wp-content/uploads/2013/04/by-nc-nd.eu_petit.png

Preface

As Convener of the Organizing and Scientific Committee of the 7th Workshop on Agri-Food Research for young researchers (WIA2018) and Coordinator of the Doctoral Program in Advanced Techniques for Research and Development in Food and Agriculture (TAIDA), I am very proud to see in this proceedings book the excellent presentations conducted by the PhD candidates of our Program. Presentations showed a great scientific interest and reflect the high potential of the Research Groups that belong to the several departments and institutions integrated into our PhD Program (UPCT, CEBAS-CSIC, and IMIDA). We expect that during the celebration of this Workshop, the coexistence and exchange of ideas and experiences among PhD candidates, research groups, researchers, technicians, etc.. has been favored.

The scientific program is structured into four sessions: Food Technology and Engineering, Plant Production Technology and Engineering, Agroforestry Engineering and Agrifood Biotechnology, depending on the topics of interest involved in our Program. We also had two invited lectures to strengthen the knowledge that researchers are gaining in their formation during this stage and we consider very useful for other researchers. The Scientific and Organizing Committee considered that it is necessary that PhD candidates must undertake this formative training activity to acquire the typical skills of a PhD, remarking how to summarize their results, highlight their importance, clearly and concisely presenting and disseminating their results to a diverse audience in a limited time, as usually happens in the presentations at worldwide scientific conferences and symposiums.

Conclusively, I want to thank, on behalf of the Scientific Committee, the participation of PhD candidates and their advisors, as well as the high quality of the presentations.

Prof. Francisco Artés-Hernández PhD

Convener of the 7th Workshop on Agri-Food Research (WIA2018)

As Director of the International Doctoral School, I consider that it is a key aspect of the preparation of PhD students in our University to develop the skills needed to succeed in their PhD degree.

In order to do that, one of the most relevant skills is the ability to analyse, summarise, present and discuss their achievements in front of a specialised audience in scientific meetings. In this respect, the Workshop on Agri-Food Research (WIA) offers an excellent opportunity to PhD students of the Doctoral Program in Advanced Techniques for Research and Development in Food and Agriculture (TAIDA) to present and comment on some of their results and to receive valuable feedback from experienced scientists in this field.

The WIA 2018 has been very interesting due to the high scientific quality of the results presented, and the preparation and commitment of the PhD students that have participated in it. Additionally, there have been three keynote lectures that have provided an excellent example to the students on how to present top-level scientific knowledge.

These Proceedings summarise the scientific contributions presented and they illustrate the excellent level of the 2018 Workshop, allowing the dissemination of its major achievements.

I would like to thank the organisers (the Committee of the TAIDA Program led by Dr. Francisco Artés-Hernández), the PhD students and their supervisors, the keynote speakers and the staff of the School of Agronomical Engineering and the Polytechnic University for their hard work, that has made it possible to organise a successful workshop. I encourage them all to continue to work so successfully for the benefit of our PhD students in the future.

Prof. Pablo Fernández-Escámez PhD

Director of the International Doctoral School- EINDOC

Universidad Politécnica de Cartagena

INDEX

KEYNOTE SPEAKERS

«The energy of the talents». The policies of generation, retention and attraction of talent as key to the new research and innovation systems

A. González Valverde* 11

Skills for international activities

S. Nicola* 12

ORAL SESSION I: Food Technology and Engineering

High relative expression of two genes of a melon near-isogenic line versus its parental during ripening

M. Zarid*, C. Esteras, A.G. Sifres, X. Cañizares, J. Esteva, M. Belén Picó, A.J. Monforte, J.P. Fernández-Trujillo 14

Broccoli by-product revalorization for a kale-based green pesto sauce

N. Castillejo*, G.B. Martínez-Hernández, F. Artés, F. Artés-Hernández 18

Effects of an innovative potassium permanganate-based ethylene scavenger during blueberry storage

M.H. Álvarez-Hernández*, G.B. Martínez-Hernández, F. Avalos-Belmontes, F. Artés-Hernández ... 22

Effect of stevia extracts on total phenolics and antioxidant capacity of kale juice spheres

T. V. Klug*, E. Collado, G. B. Martínez–Hernández, F. Artés, F. Artés–Hernández 26

Influence of the refrigerated storage temperature on shelf life of seabream fillets

L. Navarro-Segura*, M. Ros-Chumillas, A. López-Gómez..... 30

Quality changes of fresh-cut faba bean seeds processed under different sanitizers

E. Collado*, F. Artés-Hernández, E. Aguayo, F. Artés, P. A. Gómez 34

Study of the FTase activity of different commercial enzymes for the production of scFOS

M.J. Sánchez-Martínez*, S. Soto-Jover, A. López-Gómez 38

In vitro response of *Penicillium ulaiense* to postharvest fungicides

M.A. Parra*, R. Pérez, J.A. Martínez 42

ORAL SESSION II: Plant Production Technology and Engineering

Improvement of yield and quality fruit in water stressed through selection of pepper rootstocks A. Gálvez*, F. Pérez-Alfocea, F. M. del Amor, J. López-Marín	47
ABA-overproduction response under salinity A. Martínez-Pérez*, A. Ferrández-Ayela, A.B. Sánchez-García, A. Albacete, Z. Kevei, L. Estellés, F. Mohareb, A. Thompson, M. Gifford, J.M. Pérez-Pérez, F. Pérez-Alfocea, C. Martínez-Andújar.....	51
Comparing the impacts of drip irrigation by freshwater and reclaimed wastewater on the soil microbial community of two citrus species J. Abadía*, F. Bastida, E. Nicolás	55
Use of a new compost in the production of baby-leaf lettuce in floating systems A. Giménez*, J.A. Fernández, C. Egea-Gilabert, J.A. Pascual	59
Effect of regulated deficit irrigation on vegetative growth and yield of sweet cherry V. Blanco*, P.J. Blaya-Ros, A. Pérez-Pastor, R. Domingo	63
Resistance of <i>Orius laevigatus</i> (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) to lambda-cyhalothrin V. Balanza*, J.E. Mendoza, P. Bielza	67
Metal mobility assessment in semiarid mine tailings amended with biochar and urban compost: results of a bioassay employing a pioneer plant species O. Martínez-Oró*, I. Párraga-Aguado, M.N. González-Alcaraz, H.M. Conesa	71
Differences on fecundity between wild and commercial <i>Orius laevigatus</i> (Hemiptera: Anthocoridae) populations when reared on <i>Ephestia kuehniella</i> eggs J. E. Mendoza*, V. Balanza, P. Bielza.....	75

ORAL SESSION III: Agroforestry Engineering

Producing lettuce in soil-based or in soilless outdoor systems. Which is more profitable? M.A Martínez-Maté*, B. Martín-Górriz, J. F. Maestre Valero.....	80
Safety device for the automatic operation of roll over protective structure for agricultural tractors D. Ojados Gonzalez*, B. Martin-Gorriz, I. Ibarra Berrocal	84
Design and 3D prototyping of four portable buried weighing lysimeters for horticultural crops J.A. Nicolás-Cuevas*, D. Parras-Burgos, L. Ruiz-Peñalver, J.M. Molina-Martínez.....	88

ORAL SESSION IV: Agrifood Biotechnology

Composition of fatty acids of the rabbit meat in function of the genetic line and the diet A.M. Martínez-Bas*, M. Kessler, J.J. Marín, E. Armero.....	93
--	----

Understanding genetic mechanisms underpinning volatile emission	
V. Ruiz-Hernández, J. Weiss, M. Egea-Cortines.....	97
Agronomic evaluation of Levante 20°, Levante 40° y Levante 45°, varieties of the peach breeding program (<i>Prunus persica</i> L.): IMIDA-NOVAMED	
A. Guevara*, A. Carrillo, F. García, D. López, M.B. Lopez, J. Cos.....	101
Second generation of viral vectors based on pepino mosaic virus	
F. Ruiz-Ramón*, N.R. Sempere, F.E. Méndez-López, M.A. Sánchez-Pina, M.A. Aranda.....	105
Machine learning for leaf segmentation in NIR images based on wavelet transform	
F. Pérez-Sanz*, P.J. Navarro, M. Egea-Cortines, J.Weiss.....	109
Effect of silencing <i>PhZTL</i> in scent emission in <i>Petunia</i> (<i>Petunia x hybrida</i>)	
M.I, Terry*, M. Egea-Cortines, J. Weiss.....	113
Shoot induction and plant regeneration of <i>Limonium sinuatum</i> from young leaves	
J. Sánchez*, A. A. Calderón.....	117
Design of guide RNA for gene editing of <i>Gigantea</i> in Solanaceae	
C. Brandoli*, C. Petri Serrano, J. Weiss.....	121

POSTER SESSION I: Food Technology and Engineering

Healthier and gluten-free refrigerated breaded meat products	
I. Pérez*, J. Maté, A. López.....	126
Microbiological identification from foods of vegetable origin and the evolution during the processing	
M. Clemente-Carazo*, P.S. Fernández, P.M. Periago.....	130
Effect of a new rich in bioactive compounds beverage for energetic metabolism modulation in overweight adults	
V. Agulló*, C. García-Viguera.....	134
Innovation in the information of labeling and food packaging as a tool of the circular economy	
J.M. Donate*, M.D. de Miguel.....	138
Development of an antimicrobial active cardboard packaging including encapsulated natural antimicrobial agents, for bulk packaging of fresh tomatoes and peppers	
L. Buendía-Moreno*, S. Soto-Jover, A. López-Gómez.....	142
Reduction of the environmental impact in the agri-food industry through the transformation of bio-waste into new foods processed with emerging technologies	
P. Martínez*, A. Martínez, E. Aguayo.....	146

POSTER SESSION II: Plant Production Technology and Engineering

Functional regeneration of soils affected by mine wastes in Mediterranean environments and their resilience against climate change scenarios

A. Peñalver-Alcalá*, J. Álvarez-Rogel, M.N. González-Alcaraz..... 151

Sustainable precision irrigation in citrus with water of different quality

A.B. Mira-García*, M.C. Ruiz-Sánchez, E. Nicolás-Nicolás 155

Analysis of plant and soil water status indicators and its application to automatic deficit irrigation scheduling of fruit tree

P. J. Blaya-Ros*, R. Torres, V. Blanco, R. Domingo..... 159

POSTER SESSION III: Agrifood Biotechnology

Establishment of a sea bream (*Sparus aurata*) breeding program in the Region of Murcia

M. Marín, E. Armero, E. María Dolores, G. Ramis..... 164

Development of bioinformatics tools for phenotyping with artificial vision

M.V. Díaz-Galián*, P.J. Navarro, M. Egea-Cortines..... 168

Development of loss of function alleles based on CRISPR/CAS9 to study flower and fruit development

Semih Arbatli*, Julia Weiss; Marcos Egea-Cortines..... 172

Impact of crop diversification and low-input farming on soil microbial diversity

O. Özbolat*, M. Egea-Cortines, R. Zornoza..... 175

Organizers



Universidad
Politécnica
de Cartagena



Collaborators



Grupo
G's España



Keynote speakers

«The energy of the talents». The policies of generation, retention and attraction of talent as key to the new research and innovation systems

«La energía de los talentos». Las políticas de generación, retención y atracción del talento como clave de los nuevos sistemas de investigación e innovación

A. González Valverde*

Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia. C/Manresa, 5, Entlo. 30004. Murcia. Spain.

*antonio.gonzalez@fseneca.es

Abstract

The recruitment, training and talent attraction policies have become key elements in a new generation of national, regional and international research and innovation systems. The recognition and promotion of R + D + I talent and their incorporation into the labor market, both in the public and private spheres, their stability and the facilities for the development of an independent research career integrate the strategies and policies of R + D + i for its ability to profoundly transform these systems, increasing their competitiveness, their internationalization, their opportunities to participate in multidisciplinary and inter-institutional research activities, projects and programs and their capacity for insertion and collaboration in broad knowledge networks. The attraction of international research talent has quickly become a key element of the new models of organization of universities and public research organizations as well, guiding their strategies in search for excellence, international positioning and economic and social value of knowledge.

Keywords: knowledge; excellence; internationalization; R & D policies and strategies.

Resumen

Las políticas de captación, formación y atracción de talento se han convertido en elementos clave en una nueva generación sistemas de investigación e innovación internacionales, nacionales y regionales. El reconocimiento y promoción del talento en I+D+i y su incorporación laboral, tanto en el ámbito público como en el privado, su estabilidad y las facilidades para el desarrollo de una carrera investigadora independiente integran las estrategias y políticas de I+D+i por su capacidad para transformar en profundidad dichos sistemas, incrementando su competitividad, su internacionalización, sus oportunidades de participación en actividades, proyectos y programas de investigación multidisciplinar e interinstitucional y su capacidad de inserción y colaboración en amplias redes de conocimiento. La atracción de talento investigador internacional se ha convertido así mismo rápidamente en un elemento clave de los nuevos modelos de organización de universidades y organismos públicos de investigación, guiando sus estrategias de búsqueda de la excelencia, posicionamiento internacional y valorización económica y social del conocimiento.

Palabras clave: Conocimiento; excelencia; internacionalización; políticas y estrategias de I+D+i.

Skills for international activities Habilidades para las actividades internacionales

S. Nicola*

Department of Agricultural, Forest and Food Sciences – DISAFA. Vegetable Crops & Medicinal and Aromatic Plants – VEGMAP. University of Turin – Italy.

Via Leonardo da Vinci, 44 – L.go P. Braccini, 2 – 10095 – Grugliasco (TO). Italy.

*silvana.nicola@unito.it

Abstract

Skills for international activities can serve students and researchers. Many questions arise when we wonder what is needed to be engaged in international activities. Examples encompasses: Why should you learn a second language? How international experience can help? What international exposure would be more helpful for your career? Which opportunities you know are available for spending time abroad for an international experience? Personal experience is important, but there are basic aspects that need to be learned. International activities cover main aspects of science. As scientists, we need to learn and gain several competences in order to be able to interact with colleagues and peers around the world. We need to learn a common and used language (English); we need to understand fundamental aspects for international relations (Mutual Understanding); we need to have a cutting edge advantage for having a broad and international experience (Competences). Students approaching advanced studies need good attitude and many qualities: adaptability, autonomy, organization, communication skills, knowledge of more than one language, good motivation, high flexibility, and a broad perspective, cultural awareness.

Keywords: International experience; mutual understanding; international competences.

Resumen

Las habilidades para actividades internacionales pueden servir a estudiantes e investigadores. Muchas preguntas surgen cuando nos preguntamos qué se necesita para participar en actividades internacionales, entre ellas: ¿Por qué deberías aprender una segunda lengua? ¿Cómo puede ayudar la experiencia internacional? ¿Qué exposición internacional sería más útil para tu carrera? ¿Qué oportunidades sabes que están disponibles para pasar tiempo en el extranjero para una experiencia internacional? La experiencia personal es importante, pero hay aspectos básicos que deben aprenderse. Las actividades internacionales cubren los principales aspectos de la ciencia. Como científicos, debemos aprender y obtener varias competencias para poder interactuar con colegas y compañeros de todo el mundo. Necesitamos aprender un idioma común y usado (inglés); Necesitamos entender aspectos fundamentales para las relaciones internacionales (entendimiento mutuo); Necesitamos tener una ventaja de vanguardia para tener una experiencia amplia e internacional (Competencias). Los estudiantes que se aplican a los estudios avanzados necesitan una buena actitud y muchas cualidades: adaptabilidad, autonomía, organización, habilidades de comunicación, conocimiento de más de un idioma, buena motivación, alta flexibilidad y una perspectiva amplia, conciencia cultural.

Palabras clave: Experiencia internacional; entendimiento mutuo; competencias internacionales.

ORAL SESSION I:
Food Technology and
Engineering

High relative expression of two genes of a melon near-isogenic line versus its parental during ripening Mayor expresión de dos genes en una línea de melón casi isogénica versus su parental durante la maduración

M. Zarid^{1*}, C. Esteras², A.G. Sifres², X. Cañizares², J. Esteva³, M. Belén Picó², A.J. Monforte⁴, J.P. Fernández-Trujillo^{1,5}

¹Department of Agricultural & Food Engineering, Regional Campus of International Excellence “Campus Mare Nostrum” (CMN), Technical University of Cartagena (UPCT). Paseo Alfonso XIII, 48, ETSIA. E-30203 Cartagena, Murcia, Spain.

²Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad, Universitat Politècnica de València (COMAV-UPV), Camino de Vera s/n, E-46022 Valencia, Spain.

³Department of Plant Production, ETSIA. CMN, UPCT, Cartagena, Murcia, Spain.

⁴Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) UPV-CSIC, Ciudad Politécnica de la Innovación Edificio 8E, Ingeniero Fausto Elio s/n, E-46022 Valencia, Spain.

⁵Institute of Plant Biotechnology, CMN, UPCT, Cartagena, Murcia, Spain.

*m.zarid@gmail.com

Abstract

In order to compare the gene expression of a melon Near-isogenic Line (NIL) SC10-2 and its parental Piel de Sapo (PS) during ripening and to understand the differentiate mechanisms, a transcriptome sequencing was performed. *CmTCP15* (Transcription factor activity) and *CmGDSL* (Esterase and lipase activity) genes were high differentially expressed in the NIL SC10-2 compared with PS due to the introgression in LG X. Consequently, some fruit quality traits such as aroma, sweetness and probably others can be affected by such genes.

Keywords: Fruit quality; RNA-Seq; near-isogenic lines; Quantitative Trait Loci (QTLs).

Resumen

Con el fin de comparar la expresión génica de una línea casi isogénica (NIL) SC10-2 de melón y su Piel de Sapo (PS) parental durante la maduración y para comprender los mecanismos de diferenciación, se realizó una secuenciación de transcriptoma. Los genes *CmTCP15* (Factor de actividad de transcripción) y *CmGDSL* (actividad de la esterasa y la lipasa) tenían una alta expresión diferencial en el NIL SC10-2 en comparación con el PS debido a la introgresión en LG X. En consecuencia, algunos atributos de calidad de fruto como el aroma, dulzura y, probablemente otros pueden estar afectados por tales genes.

Palabras clave: Calidad de fruto; ARN-seq; Líneas casi isogénicas; Loci de Caracteres Cuantitativos (QTLs).

1. INTRODUCTION

Melon (*Cucumis melo* L.) is an important annual diploid plant belonging to the *Cucurbitaceae* family. Unfortunately, non-climacteric melon fruit ripening and quality has been little studied compared with climacteric melons. *CmTCP15* gene is a transcription factor activity, which is involved generally with the other TCP transcription factors in so many important

developmental processes and interact with so many plant hormones [1]. The *CmGDSL* gene which involved in the esterase and lipase activity, also in the hydrolase activity, lipid metabolic process, alpha-L-fucosidase activity and acting on ester bonds [2], which act directly and/or indirectly on the fruit quality traits. The goal of this paper was to compare the gene expression during melon fruit ripening using the NIL SC10-2 and its parental PS as a model system.

2. MATERIALS AND METHODS

The melon near-isogenic line (*Cucumis melo* L.) SC10-2 was obtained through marker assisted breeding from a cross between a Korean accession "Songwhan Charmi" PI 161375 (SC) and the Spanish cultivar T111 type "Piel de Sapo"(PS) [3]. SC10-2 carries an introgression on linkage group (LG) X from SC into the PS genome. Melon cultivation was under Mediterranean conditions in Torre Pacheco (Murcia, Spain) [4]. Flesh samples were obtained according to Dos-Santos et al. (2007) and stored at -80°C before freeze drying [5]. Freeze-dried samples for transcriptomic analysis were stored at -25°C. The RNA extraction was performed two times using TRI Reagent RNA isolation protocol. Highly pure total RNA was quantified with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometers (Thermo Scientific, Germany). RNA quality was verified by calculating two absorbance ratios (260/280 nm and 260/230 nm, respectively) and by electrophoresis analysis. The library from DNA free total RNA was constructed following the TruSeq™ Stranded mRNA Sample Preparation kit protocol (Illumina Inc., Redwood, CA, USA) and was sequenced using TruSeq SBS Kit v3-HS, in paired end mode with the read length 2x101bp. The transcriptomic analysis was performed in CNAG (Barcelona) according to the gene sequence reported by Garcia-Mas et al. (2012) [6]. On the other hand, flesh juice mixed with calcium chloride served for aroma volatile extraction by solid phase microextraction and GC-MS analysis for semiquantitative quantification [7]. A two-way ANOVA plus a Tukey HSD test ($p=0.01$) with interaction was performed to determine the effects of the pedigree (factor P) and the ripening time (factor t) on the aroma volatiles and gene expression using JMP 5.1 (Systat) and Statgraphics Plus for Windows 2.1 (Statistical Graphics Corp., Herndon, VA, USA).

3. RESULTS AND DISCUSSION

Though in this experiment we had almost 1500 showing differential expression, we focus on two genes with higher differential expression in NIL SC10-2 versus PS that are located in LG X (Fig. 1). First, a gene associated with the transcription activity known MELO3C012086 (*CmTCP15*), located in CM3.5_scaffold00016 from 2960759 to 2962531 [8] (Fig. 1A). On the other hand, we also studied a gene associated with the esterase and lipase activity known MELO3C011939 (*CmGDSL* esterase/lipase), located in CM3.5_scaffold00016 from 1874087 to 1877752 [9] (Fig. 1B).

CmTCP15 in addition of the transcription activity with others factors affect the synthesis of methyl jasmonate, a hormone that has multiple functions in plant development [10] does also affect the cell cycle [11]. Apart from hormonal control of growth, *CmTCP15* with others TCP transcription factors are also involved in other biological processes that in turn affect growth [12], and implying a role in diurnal regulation of transcripts of the mitochondrial oxidative phosphorylation machinery [13]. Also, *CmGDSL* gene expression showed significantly higher levels in SC10-2 than in PS during ripening (Fig. 1B). *CmGDSL* esterase/lipase with the esterase and lipase activity up-regulated and significantly correlated with ethylene production [14]. In melon as in apple, the typical aroma compounds are fruity esters that develop during ripening with the maximum endogenous ester concentration occurring at the climacteric peak [15]. These compounds can be broadly separated into straight- and branched-chain esters. Straight-chain esters are synthesized from fatty acids via the lipoxygenase (LOX) pathway, whereas branched-

chain esters are produced from the metabolism of branched-chain amino acids such as isoleucine [16]. Fatty acids are important precursors in the formation of the characteristic aroma in tomato, apple, kiwifruit pear and melon [17, 18].

The introgression of SC10-2 is located in homozygosis in whole LG X [19], also MELO3C012086 (*CmTCP15*) and MELO3C011939 (*CmGDSL* esterase/lipase), that surely have a contribution delaying ripening of such NIL vs PS [20]. Environmental conditions and preharvest history of each fruit can also affect the gene expression [21].

4. CONCLUSIONS

The introgression of SC10-2 in the LG X was associated with two differentially expressed genes that can be associated with noticeable differences in fruit quality and delayed ripening in the NIL with introgression in LG X.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support: Fundación Séneca de la Región de Murcia (11784/PI/09), MINECO & UE-FEDER funds (AGL2010-20858). Thanks for the technical assistance to P. Varó and his team in CIFEATorrepacheco (Consejería de Agricultura, Región de Murcia), N. Dos-Santos, E. Cuadros, M. García-Gutiérrez, A. Hakmaoui (UPCT), M.J. Roca (SAIT-UPCT), and IRTA-CRAG for the seeds of the NIL.

6. REFERENCES

- [1] Danisman, S. 2016. TCP Transcription Factors at the interface between environmental challenges and the plant's growth responses. *Front Plant Sci.* 7: 1930. DOI: [10.3389/fpls.2016.01930](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01930)
- [2] www.melonomics.net
- [3] Perpiñá, G., Esteras, C., Gibon, Y., Monforte, A.J., Picó, B. 2016. A new genomic library of melon introgression lines in a cantaloupe genetic background for dissecting desirable agronomical traits *BMC Plant Biol.* 16: 154. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0842-0>
- [4] Eduardo I, Arus P., Monforte A.J., 2005. Development of a genomic library of near isogenic lines (NILs) in melon (*Cucumis melo* L.) from the exotic accession PI161375. *Theor. Appl. Genet.* 112: 130-148. DOI: [10.1007/s00122-005-0116-y](https://doi.org/10.1007/s00122-005-0116-y)
- [5] Dos-Santos, N., Obando, J., Ostos, I., Melgarejo, LM., Moreno, E., Monforte, A.J., Fernández-Trujillo, J.P. 2007. Optimization of the extraction of organic acids in lyophilized melon pulp and analysis by high-performance liquid chromatography. *Proc. IV Ibero-American Virtual Congress of Quality Management in Laboratory.* May 2-June 30, 2007. pp. 203-211. I.S.B.N 978-84-491-0796-2.
- [6] Garcia-Mas J., Benjak A., Sanseverino W., Bourgeois M., Mir G., González V. M., Hénaff E., Câmara F., Cozzuto L., Lowy E., Alioto T., Capella-Gutiérrez S., Blanca J., Cañizares J., Ziarsolo P., Gonzalez-Ibeas D., Rodríguez-Moreno L., Droege M., Du L., Alvarez-Tejado M., Lorente-Galdos B., Melé M., Yang L., Weng Y., Navarro A., Marques-Bonet T., Aranda M. A., Nuez F., Picó B., Gabaldón T., Roma G., Guigó R., Casacuberta J. M., Arús P., Puigdomènech P. 2012. The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 109:11872-11877.
- [7] Chaparro-Torres, L.A., Bueso, M.C., Fernández-Trujillo, J.P. 2016. Aroma volatiles at harvest obtained by HSSPME/GC-MS and INDEX/MS-E-nose fingerprint discriminate climacteric behavior in melon fruit. *J. Sci. Food Agr.* 96: 2352-2365. DOI: [10.1002/jsfa.7350](https://doi.org/10.1002/jsfa.7350)
- [8] <http://melonomics.net/feature/MELO3C012086/>
- [9] <http://melonomics.net/feature/MELO3C011939/>
- [10] Schommer C., Palatnik J.F., Aggarwal P., Chételat A., Cubas P., Farmer E.E., Nath U., Weigel D. 2008. Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *PLoS Biol.* 6(9): 1991-2001. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060230>

- [11] Swiatek A., Lenjou M., Van Bockstaele D., Inzé D., Van Onckelen H. 2002. Differential effect of jasmonic acid and abscisic acid on cell cycle progression in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiol.* 128(1): 201-211. DOI: [10.1104/pp.010592](https://doi.org/10.1104/pp.010592)
- [12] Welchen E., Gonzalez D.H. 2006. Overrepresentation of elements recognized by TCP-domain transcription factors in the upstream regions of nuclear genes encoding components of the mitochondrial oxidative phosphorylation Machinery. *Plant Physiol.* 141(2): 540-545. DOI: [10.1104/pp.105.075366](https://doi.org/10.1104/pp.105.075366)
- [13] Giraud E., Ng S., Carrie C., Duncan O., Low J., Lee C.P., Van Aken O., Millar A.H., Murcha M., Whelan J. 2010. TCP transcription factors link the regulation of genes encoding mitochondrial proteins with the circadian clock in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* 22: 3921-34. DOI: [10.1105/tpc.110.074518](https://doi.org/10.1105/tpc.110.074518)
- [14] Zhang Z., Jiang S., Wang N., Li M., Ji X., Sun S., Liu J., Wang D., Xu H., Qi S., Wu S., Fei Z., Feng S., Chen X. 2015. Identification of differentially expressed genes associated with apple fruit ripening and softening by suppression subtractive hybridization. *PLoS One.* 10(12): 1-17 (e0146061). DOI: [10.1371/journal.pone.0146061](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146061)
- [15] Defilippi B.G., Dandekar A.M., Kader AA. 2005. Relationship of ethylene biosynthesis to volatile production, related enzymes, and precursor availability in apple peel and flesh tissues. *J. Agric. Food Chem.* 53: 3133-3141. DOI: [10.1021/jf047892x](https://doi.org/10.1021/jf047892x)
- [16] Souleyre E.J., Greenwood D.R., Friel E.N., Karunairetnam S., Newcomb R.D. 2005. An alcohol acyl transferase from apple (cv. Royal Gala), MpAAT1, produces esters involved in apple fruit flavor. *FEBS J. Jun*; 272: 3132-3144.
- [17] Schwab W., Davidovich-Rikanati R., Lewinsohn E. 2008. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant J. May.* 54(4): 712-732. DOI: [10.1111/j.1365-313X.2008.03446.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03446.x)
- [18] Zarid M., Esteras C., Gemma Sifres A., Cañizares X., Esteva J., Picó B.M., Monforte A.J., Fernández Trujillo J.P. 2017. Gene expression and volatile production during melon ripening. In: Proc. 6th Workshop Agri-Food Res., 1st ed, F. Artés-Hernández, M. Egea-Cortines, J.A. Fernández-Hernández, J. Calatrava, E. Aguayo, J.J. Alarcón, J.E. Cos, eds. (CRAI Biblioteca. Universidad Politécnica de Cartagena, Murcia, España). Pp. 27-30. <http://hdl.handle.net/10317/6706>
- [19] Escudero, A.A., Zarid, M., Bueso, M.C., Fernández-Trujillo, J.P. 2017. Aroma volatiles during non-climacteric melon ripening and potential association with flesh firmness. VIII International Postharvest Symposium. Postharvest 2016. Cartagena 21-24/06/2016: Enhancing Supply Chain and Consumer Benefits – Ethical and Technological Issues Eds.: F. Artés-Hernández, P. Gómez, E. Aguayo, F. Artés. Pages 363-366. https://www.ishs.org/ishs-article/1194_50
- [20] Dos-Santos, N., Bueso, M., Fernández-Trujillo, J.P. 2013. Aroma volatiles as biomarkers of textural differences at harvest in non-climacteric near-isogenic lines of melon. *Food Res. Int.* 54: 1801-1812.
- [21] Zarid, M., Fernández-Trujillo, J.P. 2016. Seasonal effect on selected quality traits of a melon near-isogenic line. In: Proc. 5th Workshop Agri-Food Res., 1st ed, F. Artés-Hernández, M. Egea-Cortines, J.A. Fernández-Hernández, J. Calatrava, E. Aguayo, J.J. Alarcón, J.E. Cos, eds. (CRAI Biblioteca. Universidad Politécnica de Cartagena, Murcia, España). Pp. 44-47.

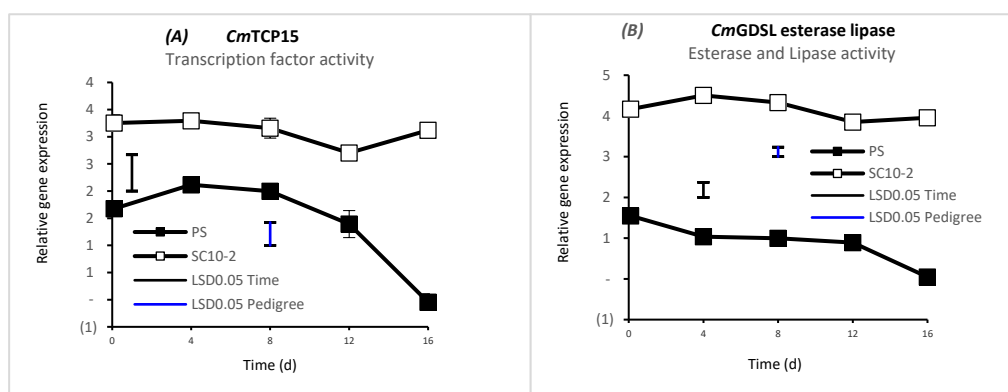


Figure 1. Relative genes expression of the NIL SC10-2 and its parental control PS, (mean \pm SE, n=3). (A) *CmTCP15*: Transcription factor TCP15, (B) *CmGDSL*: Esterase and lipase activity.

Broccoli by-product revalorization for a kale-based green pesto sauce

Revalorización de subproducto del brócoli para elaborar un pesto a base de kale

N. Castillejo^{1*}, G.B. Martínez-Hernández¹, F. Artés¹, F. Artés-Hernández¹

¹Departamento de Ingeniería de Alimentos, Grupo Postrecolección y Refrigeración, Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT), Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena, Murcia, Spain.

*noelia.castillejo@upct.es

Abstract

Vegetable consumption can be increased by the development of new products such as a pesto sauce including kale, because this vegetable has a high content of bioactive compounds. In addition, revalorization of broccoli by-products helps to manage the daily generated high agricultural wastes. This work presents data related to quality and bioactive contents changes of two kale-based sauces (including or not -CTRL- broccoli leaves) throughout 21 days at 5°C. During storage no differences on total phenolics/ antioxidant capacity between sauces without or with broccoli by-product were found, except an 30.66/55.22% increase on day 21 on Sauce+Byproduct regarding CTRL. Sensory analyses of both pesto sauces showed scores higher than the limit of usability throughout the storage. Sauce+Byproduct pesto sauce was preferred by panelists. Therefore, the revalorization of broccoli by-product for a pesto sauce did not induce differences in the bioactive compounds content and even improved its sensory quality.

Keywords: *Brassica*; broccoli cv. Parthenon; shelf-life; phenolics; antioxidant.

Resumen

El consumo de hortalizas puede incrementarse con la incorporación de nuevos productos como un pesto a base de kale, que es rico en compuestos bioactivos. Además, la revalorización de subproductos agrícolas permite aprovechar los generados diariamente. En este trabajo se presentan los resultados de dos salsas tipo 'pesto' de kale (una con hojas de brócoli y otra sin ellas -CTRL-) durante 21 a 5°C. No hubo diferencias en el contenido de polifenoles/capacidad antioxidante en la Salsa+Subproducto con respecto a la salsa CTRL, salvo en el día 21 donde se observó una disminución del 30,66/55,22%. El análisis sensorial de ambas salsas obtuvo valores superiores a 3 (límite de comercialización) durante la conservación, destacando la Salsa+Subproducto. Por tanto, la revalorización del subproducto de brócoli para un pesto a base de kale no indujo diferencias en el contenido de compuestos bioactivos e incluso mejoró la calidad sensorial.

Palabras clave: *Brassica*; brócoli cv. Parthenon; vida comercial; fenoles; antioxidante.

1. INTRODUCCIÓN

El consumo de frutas y hortalizas está por debajo del consumo diario recomendado (400 g) [1,2], por lo que el desarrollo de nuevos productos puede ser una buena forma de promocionar su consumo. Las propiedades beneficiosas para la salud asociadas con las crucíferas (familia

Brassicaceae) están generalmente relacionadas con sus compuestos bioactivos como los fenólicos, de alta capacidad antioxidante, los glucosinolatos, la vitamina C, etc. [3,4]. El objetivo de este trabajo fue aprovechar subproductos del brócoli como fuente de compuestos bioactivos incorporándolos en la elaboración de nuevos productos como una salsa verde a base de kale. Además, se estudió la evolución de estos compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante durante su vida comercial bajo refrigeración.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Tras ensayos preliminares, la salsa sin subproducto de brócoli (CTRL) estuvo compuesta por 73,4% kale, 22,13% aceite de oliva, 3,67% zumo de limón, 0,4% sal y 0,4% azúcar. Para elaborar la Salsa+Subproducto se utilizó la fórmula anterior pero el 73,4% se repartió al 50% entre kale y hojas de brócoli cv. Parthenon. Las hojas de kale y de brócoli se lavaron con agua clorada (100 ppm de NaClO), se secaron y se envasaron bajo vacío parcial en bolsas gofradas. Las hojas envasadas se sometieron a un tratamiento térmico (85°C, 8 min) en baño de agua. Seguidamente se pesaron las cantidades necesarias de cada ingrediente (según las fórmulas anteriores) bajo una campana de flujo laminar para reducir contaminaciones y se homogeneizaron en un Robot Cook (Robot Coupe, Vincennes Cedex, France) durante 90 s a 1450×g + 30 s a 1864×g. Finalmente, las salsas tratadas se envasaron a vacío y se conservaron a 5°C. Se realizaron 3 réplicas por cada salsa y día de análisis.

2.2 Análisis de polifenoles totales

Se preparó un extracto común para fenoles totales (FT) y capacidad antioxidante total (CAT). Para ello, se pesó 1 g de muestra congelada y se añadieron 4 mL de metanol. Dicha mezcla se agitó durante 1 h a 200×g en un agitador orbital (Stuart, Staffordshire, Reino Unido) en lecho de hielo y en oscuridad. Seguidamente, los extractos anteriores se centrifugaron (15.000×g, 10 min, 4°C) usándose el sobrenadante como extracto de FT y CAT.

El contenido de FT se determinó por el método de Singleton y Rossi [5] con las modificaciones propuestas por Martínez-Hernández et al., 2011 [6]. Se dispusieron 40 µL del extracto en una placa de poliestireno (PS) de 96 pocillos (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Alemania) a los que se añadieron 15 µL de solución Folin-Ciocalteu 2 N. Esta mezcla se dejó 3 min incubando a temperatura ambiente y en oscuridad. Terminada la incubación se añadieron 190 µL de buffer alcalino (0,4% Na₂CO₃ y 2% NaOH) y se dejaron reaccionar durante 1 h en oscuridad a temperatura ambiente. Tras 1 h se midió la absorbancia a 750 nm con un lector de placas Multiscan (Tecan Infininte M200, Männedorf, Suiza). El contenido de FT se expresó como mg de equivalentes de ácido gálico (eAG) por 100 g⁻¹ de producto fresco (pf). Todos los extractos se analizaron por triplicado.

2.3 Análisis de capacidad antioxidante total

La CAT se determinó por el método de Brand-Williams [7] con las modificaciones propuestas por Martínez-Hernández et al., 2011 [6]. Para ello se tomaron 40 µL del extracto y se dispuso en una placa de PS de 96 pocillos seguidos de 210 µL de una disolución 0,7 M de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (ajustada previamente a abs_{517nm} de 1,1±0,02) y se dejó reaccionar durante 1 h en oscuridad a temperatura ambiente. Tras 1 h se midió la absorbancia a 517 nm con el lector de placas. Los resultados se expresaron en mg de equivalentes de Trolox por 100 g⁻¹ pf. Todos los extractos se analizaron por triplicado.

2.4. Análisis estadístico

El análisis de la varianza se realizó comparando el tipo de salsa y el tiempo de conservación usando el paquete estadístico Statgraphics Plus software (vs. 5.1, Statpoint Technologies Inc., Warrenton, USA). Las diferencias estadísticas se valoraron a un nivel de significación de $p \leq 0,05$, y se usó el test de Tukey de rango múltiple para la separación de medias.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los contenidos de FT iniciales de las salsas CTRL y Salsa+Subproducto fueron 58,75 y 36,78 mg eAG 100 g⁻¹ pf, respectivamente, sin diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ellas. Según Ferreira et al. (2018) [8], el contenido de fenoles de subproductos de brócoli (hojas) era 13,7–26,1 mg eAG 100 g⁻¹ pf, siendo similares proporcionalmente al contenido de las hojas de brócoli que contenía la Salsa+Subproducto. No se obtuvieron diferencias entre ambas salsas durante la conservación excepto en el día 21 en el que se observó una disminución del 30,66% de la Salsa+Subproducto con respecto al CTRL (Fig. 1).

La CAT inicial fue 52,03 y 46,87 mg Trolox 100 g⁻¹ pf para el CTRL y Salsa+Subproducto, respectivamente, sin diferencias significativas entre ellas. No se obtuvieron diferencias entre ambas salsas durante la conservación, excepto en el día 21 (Fig. 2), en el que se observó una reducción de CAT del 55,22% de la Salsa+Subproducto con respecto al CTRL. Este mismo comportamiento observado para los FT pone de manifiesto la alta correlación de la CAT de estas salsas con el contenido de FT.

La aceptabilidad global de ambas salsas fue muy similar en el día inicial y final, siendo superior la de la Salsa+Subproducto. La calidad sensorial de las muestras no estuvo en ningún momento por debajo del límite de comercialización para los parámetros sensoriales estudiados. Tras 21 días de conservación la salsa CTRL destacó por su coloración más intensa, pero la Salsa+Subproducto presentó mejor apariencia visual (datos no mostrados).

4. CONCLUSIONES

La adición de subproducto de brócoli a la salsa de kale no supuso un aumento de la CAT ni de los FT. Durante la conservación refrigerada dichos compuestos se mantuvieron constantes sin diferencias entre la adición o no de hojas de brócoli. En el análisis sensorial se observó una mejor aceptación de la salsa que contenía subproducto del brócoli. Por tanto, se puede reducir el contenido de kale y añadir hojas de brócoli, que no tienen otro aprovechamiento comercial, sin alterar los compuestos fenólicos y antioxidantes de la salsa y, además, se mejora su sabor.

5. AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Ministerio de Economía y Competitividad la concesión de un contrato predoctoral (FPU) a Noelia Castillejo y a SAKATA SEED IBÉRICA S.L.U. la financiación y aporte de material vegetal.

6. REFERENCIAS

[1] WHO/FAO. 2003. Population nutrient intake goals for preventing diet-related chronic diseases. In: Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. Geneva: WHO Technical Report Series, 916, p.95.

[2] Castillejo N., Martínez-Hernández G.B., Mónaco K., Gómez P.A., Aguayo E., Artés F., Artés-Hernández F. 2016. Preservation of bioactive compounds of a green vegetable smoothie using short time-high temperature mild thermal treatment. Food Sci. Technol. Int. 23(1): 46-60.

[3] Latte K.P., Appel K., Lampen A. 2011. Health benefits and possible risks of broccoli—an overview. *Food Chem. Toxicol.* 49: 3287–3309.

[4] Radošević K., Srček V.G., Bubalo M.C., Brnčić S.R., Takács K., Redovniković I.R. 2017. Assessment of glucosinolates, antioxidative and antiproliferative activity of broccoli and collard extracts. *J. Food Composit. Anal.* 61: 59-66.

[5] Singleton V.L., Rossi J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticul.* 16: 144–158.

[6] Martínez-Hernández G.B., Gómez P.A., Pradas I., Artés F., Artés-Hernández F. 2011. Moderate UV-C pretreatment as a quality enhancement tool in fresh-cut Bimi® broccoli. *Postharvest Biol. Technol.* 62(3): 327-337.

[7] Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* 28: 25-30.

[8] Ferreira S.S., Passos C.P., Cardoso S.M., Wessel D.F., Coimbra M.A. 2018. Microwave assisted dehydration of broccoli by-products and simultaneous extraction of bioactive compounds. *Food Chem.* 246: 386-393.

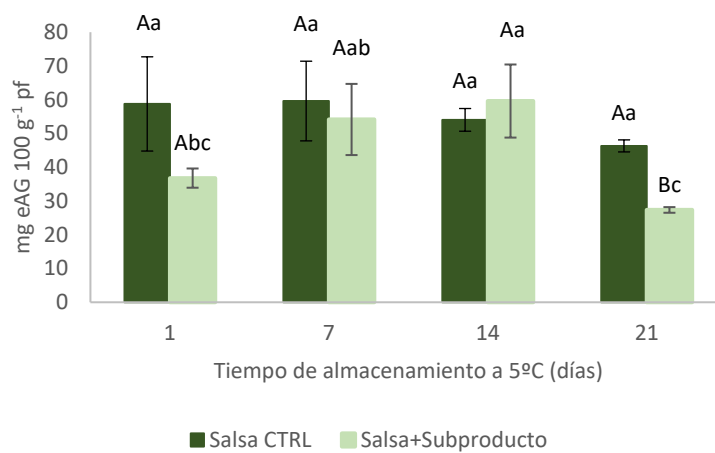


Figura 1. Contenido de fenoles totales en una salsa CTRL y una Salsa+Subproducto de brócoli almacenadas a 5°C. Letras mayúsculas diferentes denotan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre salsas para el día de muestreo. Letras minúsculas diferentes denotan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los días de muestreo para la misma salsa.

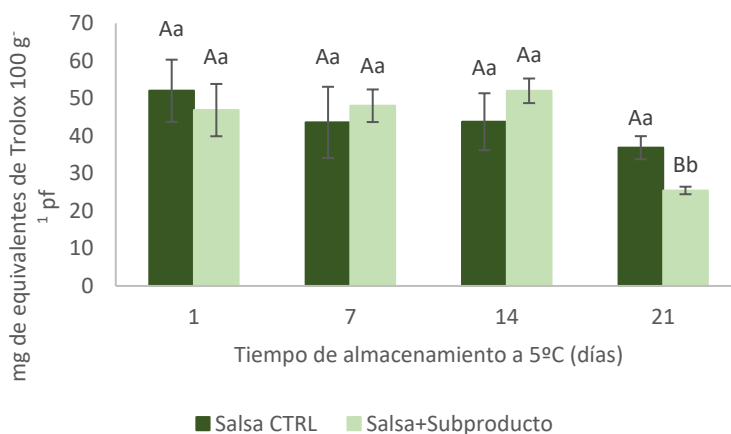


Figura 2. Capacidad antioxidante por el método DPPH de una salsa CTRL y una Salsa+Subproducto de brócoli almacenadas a 5°C. Letras mayúsculas diferentes denotan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre salsas para el día de muestreo. Letras minúsculas diferentes denotan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los días de muestreo para la misma salsa.

Effects of an innovative potassium permanganate-based ethylene scavenger during blueberry storage

Efectos de un innovador adsorbedor de etileno a base de permanganato potásico para conservar arándanos

M.H. Álvarez-Hernández^{1*}, G.B. Martínez-Hernández¹, F. Avalos-Belmontes², F. Artés-Hernández¹

¹Postharvest and Refrigeration Group. Department of Food Engineering. Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT), Paseo Alfonso XIII, 48. 30203. Cartagena, Murcia, Spain.

²Materials Research Department, Universidad Autónoma de Coahuila (UAdeC), Blvd. V. Carranza e Ing. José Cárdenas s/n. 25280. Saltillo, Coahuila, Mexico.

*hazel.alvarezhdz@gmail.com

Abstract

The effects of a novel C₂H₄ scavenger (PM) on quality attributes of blueberry fruit were studied and compared with those of a commercial product (COM). Fruit were stored at 2 and 10°C under modified atmosphere packaging (MAP), with either 0.7 g PM or 4.3 g COM. Samples under air conditions or MAP, without scavenger, were used as controls. Gas composition within packages and weight loss, decay incidence and sensorial quality of fruit were determined at defined intervals. MAP technique was able to prevent weight loss by itself. It was found that both scavengers removed C₂H₄ within packages without affecting the low O₂ partial pressures reached. However, COM showed a mild CO₂ adsorption. PM samples showed lower percentage of decay than COM samples. PM samples also showed the highest texture and sweetness scores while registered the lowest skin wrinkling after 21 days at 2°C. The results suggest that the novel material allows to delay quality degradation of blueberries, with a high cost-effectiveness.

Keywords: Weight loss; gas composition; nanoclay; ethylene oxidation.

Resumen

Se estudiaron los efectos de un nuevo adsorbedor de C₂H₄ (PM) sobre la calidad de arándano azul, y se compararon con los de un producto comercial (COM). La fruta fue almacenada a 2 y 10°C en atmósfera modificada (MAP), con 0,7 g de PM o 4,3 g de COM. Se utilizaron muestras bajo condiciones de aire o en MAP, sin adsorbedores, como controles. Periódicamente, se determinó la composición gaseosa dentro de los envases y la pérdida de peso, el decaimiento y la calidad sensorial de la fruta. La técnica de MAP fue capaz de prevenir la pérdida de peso por sí misma. Ambos materiales removieron el C₂H₄ dentro de los empaques sin afectar las bajas presiones parciales de O₂ alcanzadas, pero el producto COM mostró adsorción de CO₂. Las muestras PM mostraron menor decaimiento que las muestras COM, así como los mayores puntajes de textura y dulzura, registrando la menor rugosidad de piel el día 21 a 2 °C. En conclusión, el nuevo material permite retrasar eficazmente la degradación de la calidad del arándano.

Palabras clave: Pérdida de peso; composición gaseosa; nanoarcilla; oxidación de etileno.

1. INTRODUCCIÓN

Debido a los beneficios que se han reportado en la salud, así como a sus atractivas características sensoriales, el arándano ha recibido gran atención en las últimas décadas, lo que se refleja en un incremento en su producción y consumo a nivel mundial [1]. Los rasgos de calidad altamente valorados por los consumidores incluyen una textura firme, alto contenido de azúcar y cantidades moderadas de ácido, así como la capacidad de las frutas para mantener su textura durante el almacenamiento [2]. No obstante, el arándano es una fruta altamente perecedera [3], siendo las podredumbres por hongos y la pérdida de peso son de los principales factores que reducen la calidad del arándano, conduciendo al ablandamiento de la fruta y presencia de arrugas de su piel, entre otros efectos negativos.

Para una óptima conservación postcosecha de los productos hortofrutícolas se debe tener en cuenta tanto la temperatura de conservación como las tasas de respiración y producción de etileno (C_2H_4), junto con la sensibilidad a dicho gas. En este sentido, se ha reportado que una alta concentración de CO_2 (entre 10 a 24 kPa), junto con una baja concentración de O_2 (entre 2 a 5 kPa), resulta eficiente para controlar la incidencia de podredumbres en arándano [4]. Por otro lado, hay reportes que indican que, con el uso de inhibidores de la acción del C_2H_4 , así como oxidantes de C_2H_4 , se puede minimizar la pérdida de textura del arándano, pérdida de peso e incidencia de podredumbres [5]. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto dos adsorbedores de C_2H_4 a base de permanganato de potasio ($KMnO_4$), uno elaborado en nuestro laboratorio y otro comercialmente disponible, sobre los principales atributos de calidad del arándano.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Elaboración del adsorbedor de etileno, y envasado y conservación de las muestras

Se elaboró un material adsorbedor de C_2H_4 utilizando montmorillonita (MMT) sódica (Closite® Na⁺; Southern Clay Products Inc., Gonzales TX, USA), la cual fue protonada con HCl 0,025 M y modificada con $KMnO_4$ (10% p/p), en base al protocolo descrito por Avalos y col. [6]. Posteriormente, frutos de *Vaccinium corymbosum* var. Duke en madurez comercial (Arándanos La Peña, Asturias, Spain) fueron colocados en bandejas de polipropileno (PP) rígido, junto con una bolsa (55×55 mm) conteniendo material adsorbedor de C_2H_4 , ya sea 0,7 g del material desarrollado (PM) o 4,3 g del material comercial (COM) Bi-On® R12, Bioconservacion S.A. (Barcelona, Spain). Las bandejas fueron cubiertas con una película de PP biorientado (35 µm de grosor) y almacenadas a 2 y 10°C. Muestras en atmósfera modificada sin adsorbedor de C_2H_4 (MAP-CTRL) y muestras en bandejas de PP ventiladas (AIR-CTRL) fueron usadas como control.

2.2 Análisis de gases y determinación de pérdida de peso, decaimiento y calidad sensorial

La evolución de la composición gaseosa dentro de los envases bajo MAP fue analizada durante la conservación de las muestras. Para ello, muestras de gas fueron tomadas de los envases y analizadas mediante un cromatógrafo de gases. La pérdida de peso fue calculada como la diferencia porcentual entre el peso inicial y el peso final de los envases con muestra. El índice de podredumbres fue visualmente obtenido como previamente describe Almenar y col. [7]. Los análisis sensoriales fueron realizados de acuerdo con los estándares internacionales [8]. La incidencia de daño y severidad fue evaluada mediante la determinación de colores indeseables, sabores desagradables y malos olores. La apariencia visual, aroma, sabor, textura y calidad general fue evaluada usando una escala hedónica de aceptabilidad.

2.3 Análisis estadístico

El experimento se realizó con un diseño trifactorial (tratamiento x temperatura de almacenamiento x tiempo de almacenamiento). El efecto de los tratamientos se determinó

mediante un Análisis de Varianza usando el paquete estadístico IBM SPSS Statistics versión 22 (IBM Corporation, New York, USA). Las medias de los factores que mostraron diferencia estadística fueron comparadas usando la prueba *Tukey* en términos de $p=0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El uso de adsorbedores de C_2H_4 a base de permanganato potásico, combinado con envasado bajo MAP (3,3 kPa O_2 +12,0 kPa CO_2 a 2°C y 1,5 kPa O_2 +16,0 kPa CO_2 a 10°C), permitió extender la vida útil de los arándanos alcanzada bajo condiciones de aire, de 7 días a 21 días a 10°C y de 21 días a 46 días a 2°C. Los niveles de O_2/CO_2 obtenidos pueden ser considerados seguros [4]. No se encontró diferencia significativa ($p<0,05$) en los tratamientos en cuanto a las presiones parciales de O_2 y CO_2 durante el almacenamiento (Datos no mostrados).

El envasado bajo MAP permitió controlar eficientemente la pérdida de peso, observándose una pérdida menor a 0.7% durante el almacenamiento a 2 o 10°C, independientemente de la presencia de los adsorbedores de C_2H_4 , mientras que las muestras AIR-CTRL mostraron pérdidas mayores a 1% (Fig. 1). El índice de podredumbres de los frutos fue el principal factor que afectó la calidad postcosecha del arándano. El uso de envasado bajo MAP junto con el adsorbedor de C_2H_4 elaborado en nuestro laboratorio mostró la capacidad de disminuir la incidencia de podredumbres de manera significativa, en comparación con el adsorbedor comercial (Fig. 2). Además, los frutos conservados a 2°C con el adsorbedor de etileno desarrollado mostraron las mayores evaluaciones sensoriales en cuanto a textura y dulzor, así como menor arrugamiento de la piel de los frutos en el día 21 (datos no mostrados). La conservación a 2°C fue decisiva para prolongar la vida útil de los arándanos debido a la baja proliferación de hongos, mientras que el envasado en MAP fue más decisivo para controlar la pérdida de peso debido a la alta humedad relativa alcanzada bajo MAP, lo cual coincide con previos trabajos [9].

4. CONCLUSIONES

El innovador adsorbedor de etileno desarrollado a base de montmorillonita y permanganato potásico, es capaz de disminuir las podredumbres del arándano. Además, presentó mayor eficiencia que el adsorbedor comercial, lo cual se justifica por la menor cantidad de material utilizado.

5. AGRADECIMIENTOS

Marianela Hazel Álvarez-Hernández agradece a CONACYT-México por la beca de movilidad (Referencia: 291212) otorgada. Expresamos nuestro agradecimiento a la empresa Bioconservacion S.A. (Barcelona, Spain) por facilitarnos el producto comercial Bi-On® R12.

6. REFERENCIAS

[1] FAO. 2017. FAOSTAT Agriculture Data, In: Food and Agriculture Organisation of the United Nations. Available from: www.fao.org

[2] Konarska, A. 2015. Development of fruit quality traits and comparison of the fruit structure of two *Vaccinium corymbosum* (L.) cultivars. *Sci. Hortic.*194:79–90.

[3] El-Ramady, H.R., Domokos-Szabolcsy, É., Abdalla, N.A., Taha, H.S., Fári, M. 2015. Postharvest management of fruits and vegetables storage. In: Sustainable Agriculture Reviews Vol 15, E. Lichtfouse ed. (Springer International Publishing, Cham, Switzerland). Pp. 65–152.

[4] Harb, J.Y., Streif, J. 2004. Controlled atmosphere storage of highbush blueberries cv. "Duke." *Eur J. Hortic. Sci.* 69:66–72.

[5] Wang, S., Zhou, Q., Zhou, X., Wei, B., Ji, S. 2018. The effect of ethylene absorbent treatment on the softening of blueberry fruit. Food Chem. 246:286–94.

[6] Avalos, F., Ortiz, J.C., Zitzumbo, R., López-Manchado, M.A., Verdejo, R., Arroyo, M. 2009. Phosphonium salt intercalated montmorillonites. Appl Clay Sci. 43:27–32.

[7] Almenar, E., Samsudin, H., Auras, R., Harte, J. 2010. Consumer acceptance of fresh blueberries in bio-based packages. J. Sci. Food Agr. 90:1121–8.

[8] ASTM, 1986. Physical Requirements Guidelines for Sensory Evaluation Laboratories. American Society for Testing Materials, Philadelphia, USA.

[9] Paniagua, A.C., East, A.R., Heyes, J.A. 2014. Interaction of temperature control deficiencies and atmosphere conditions during blueberry storage on quality outcomes. Postharvest Biol. Tec. 95:50–59.

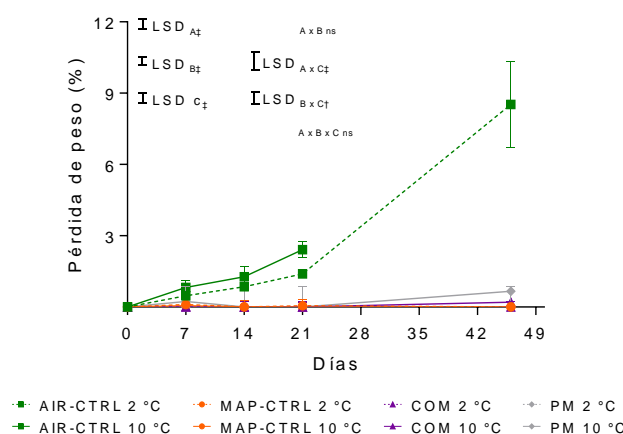


Figura 1. Pérdida de peso de arándano azul durante su almacenamiento con diferentes adsorbentes de etileno a 2 y 10 °C (n=5±DS). Las letras mayúsculas A, B y C denotan el tratamiento, la temperatura y el tiempo, respectivamente. ns, † and ‡ indican diferencias significativas, donde p ≤ no significativa, 0.01, y 0.001, respectivamente. MAP-CTRL: Control en atmósfera modificada; COM: Producto comercial; y PM: nuevo adsorbente de etileno.

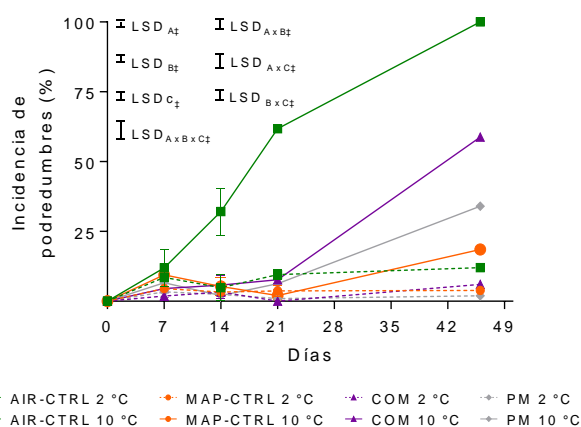


Figura 2. Incidencia de podredumbres de fruta de arándano azul durante su almacenamiento con diferentes adsorbentes de etileno a 2 y 10 °C (n=5±DS). Las letras mayúsculas A, B y C denotan el tratamiento, la temperatura y el tiempo, respectivamente. ns, † and ‡ indican diferencias significativas, donde p ≤ no significativa, 0.01, y 0.001, respectivamente. MAP-CTRL: Control en atmósfera modificada; COM: Producto comercial; y PM: nuevo adsorbente de etileno.

Effect of stevia extracts on total phenolics and antioxidant capacity of kale juice spheres

Efecto de extractos de stevia en el contenido en polifenoles y capacidad antioxidante total de esferas de zumo de kale

T. V. Klug^{1*}, E. Collado², G. B. Martínez–Hernández^{1,2}, F. Artés^{1,2}, F. Artés–Hernández^{1,2}

¹ Postharvest & Refrigeration Group. Food Engineering Department. Universidad Politécnica de Cartagena, P^a Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena, Spain.

² Institute of Plant Biotechnology (IBV). Universidad Politécnica de Cartagena. Campus Muralla del Mar, s/n. 30202 Cartagena, Spain.

* tammilaklug@gmail.com

Abstract

Kale is a vegetable with high contents of health-promoting compounds, but its consumption as a beverage is highly limited by its bitter flavour. So, the effects of different stevia extracts (S10, S25 and S50) on the total phenolic contents (TPC) and total antioxidant capacity (TAC) by DPPH and FRAP of kale juice spheres was studied during 7 days at 5 °C. Spheres were produced with a double spherification technique which allowed to obtain hydrogel spheres with high mechanical resistance. The TPC of S25 samples showed the lowest value at day 0, with differences between other samples. The higher antioxidant capacity was observed in samples evaluated by FRAP, without differences between samples. After 3 days of storage, a decrease in TAC evaluated in both assays studied (DPPH and FRAP) was observed. These results determined that kale juice spheres with different stevia extracts and with high antioxidants levels can be produced.

Keywords: *Brassica oleracea* var. *sabellica* L.; ready-to-eat; spherification, antioxidant capacity.

Resumen

Kale es una verdura con un alto contenido en compuestos beneficiosos para la salud, pero su consumo como bebida está muy limitado por su sabor amargo. Se estudió el efecto de diferentes extractos de stevia (S10, S25 y S50) sobre el contenido de compuestos fenólicos totales (TPC) y capacidad antioxidante total (TAC) mediante DPPH y FRAP de esferas de zumo de kale durante 7 días a 5 °C. Las esferas se produjeron con una técnica de doble esferificación que permitió obtener esferas de hidrogel con alta resistencia mecánica. El TPC de las muestras S25 mostró el valor más bajo en el día 0, con diferencias en relación a las otras muestras. La mayor TAC se observó en las muestras evaluadas por FRAP. Tras 3 días de almacenamiento, se observó una disminución del TAC (por DPPH y FRAP). Estos resultados determinaron que se pueden producir esferas de zumo de kale con diferentes extractos de stevia y con altos niveles de antioxidantes.

Palabras clave: *Brassica oleracea* var. *sabellica* L.; listos para consumir, esferificación, capacidad antioxidante.

1. INTRODUCTION

Consumers are showing new interest in functional and healthy food and increasing the demand for ready-to-eat products due to their lifestyle. Kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica* L.) is a vegetable which has attracted special attention from consumers in the last years due to its exhibits a high nutritional value since it is a rich source of vitamin C and phenolic compounds, which along with carotenoids are responsible for the high antioxidant activity of the raw material [1]. Bitterness of Brassica vegetables, due to the sulphur-containing compounds, can be masked by sweetening [2]. Stevia (*Stevia rebaudiana bertonii*) is a plant widely known to its sweetener properties with very low caloric content [3]. Furthermore, stevia contains several compounds responsible of their antimicrobial and antioxidant properties, among other health-promoting properties [4].

Kale juice consumption may be even enhanced, together with sweetening, by innovative presentations such as spheres. In that sense, a double gelification technique for vegetable juices has been recently modelled and optimized with high mechanical resistance [5]. The aim of the present study was to assess the effect of stevia addition on the TPC and TAC (evaluated by two different assays (DPPH and FRAP)) of kale juice spheres during 7 days at 5 °C.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant Material

Kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica* L.) was obtained from a local producer (Sacoje S.L., Lorca, Spain). Stevia (*Stevia rebaudiana bertonii*) leaves (origin from Granada, Spain) were purchased from a local store (Cartagena, Spain) and the stevia extract was obtained according to Ortiz-Viedma et al. [4].

2.2 Kale juice spherification and storage conditions

Spherification of kale juice was conducted according to an optimized spherification method with double gelation from Tsai et al. [5] with slight modifications. Kale juice spheres were stored in 50 mL plastic bottles (approximately 10 spheres per bottle) containing 40 mL of distilled water with 0.5 % NaCl. NaCl concentration was selected as having the same electrical conductivity (conductivity meter GLP32, Crison, Barcelona, Spain) than the obtained kale juice. Bottles containing the kale juice spheres were stored at 5 °C in darkness and analyzed at day 0, 3, 5 and 7 of storage. Three duplicates per treatment and sampling day were evaluated.

2.3 Total phenolic contents and Total Antioxidant Capacity

Total phenolic contents (TPC) and the antioxidant capacity (TAC) by DPPH and FRAP assays were evaluated according [6, 7, 8]. The TAC was expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) per kg⁻¹ fw and the TPC was expressed as gallic acid equivalent per kg⁻¹ fw.

2.4 Statistical analysis

An analysis of variance (ANOVA) was performed to compare different treatments and storage times at a significant level of $P \leq 0.05$ using PASW Statistics 22 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). In some cases, when significant differences were observed, the Tukey's HSD (Honestly Significant Difference) test was applied.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The initial total phenolic content (TPC) of kale spheres were 791.4±40.8, 807.1±9.3, 582.7±4.8, and 900.2±35.4 to CTRL, S10, S25 and S50, respectively (Fig. 1). S25 samples showed

the lowest value, with significant difference between other samples. Yu et al. [9] observed TPC values of kale extracts between 1.59 to 2.33 mg of gallic acid per g fresh kale. This difference might be explained by the different kale cultivars and extraction methods. After 3 days of storage, the TPC of all samples decrease around 55-65% (Fig 1.)

On the other hand, the antioxidant capacity (TAC) of kale spheres evaluated by DPPH and FRAP assays is presented in the Figure 2. TAC evaluated by DPPH assay at day 0, in kale spheres samples, showed values around 1194.9±99.4, 1304.7±11.7, 1028.9±7.9 and 1327.9±56.4 mg TAEC kg⁻¹ fw to CTRL, S10, S25, S50 treatments, respectively. The S10 and S50 samples showed significant differences in relation to S25 samples (Fig. 2). In relation to TAC evaluated by FRAP assay, a higher antioxidant capacity was observed regarding DPPH values, with values of 2145.9±211.3, 2203.4±212.6, 1994.9±136.6 and 2453.5±107.4 to CTRL, S10, S25 and S50, respectively, at day 0, and was not observed significant differences between treatments (Fig. 2).

After 3 days of storage, a decrease in the TAC by DPPH and FRAP assays was observed in all samples, which probably was due to active enzymes involved in the degradation of antioxidant compounds or because of softening or disruption of plant cell walls and the destruction of complex phenolics [10], since the values of TPC also decreased after 3 days of storage. Furthermore, kale leaves have high levels of vitamin C, which is a vitamin with high antioxidant potential, then, the previous finding may be owed to a vitamin C degradation, since vitamin C is degraded during food storage. Accordingly, higher vitamin C degradation rates have been reported in untreated green vegetables smoothies compared to heat treated samples [11].

4. CONCLUSIONS

It has been found that kale spheres with high levels of antioxidants can be produced by an innovative double spherification technique.

5. ACKNOWLEDGMENTS

Gratitude is expressed to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) of Brazil for a grant support to Tâmmila Venzke Klug. Authors are grateful to Sakata Seeds Ibérica S.L.U. for financial support and to Sacoje SCL for providing the plant material.

6. REFERENCES

- [1] Sun B., Yan H., Zhang F., Wang Q. 2012. Effects of plant hormones on main health-promoting compounds and antioxidant capacity of Chinese kale. *Food Res. Int.* 48: 359–366.
- [2] Sindhu S., Maya P., Indira T.N. 2012. A method for preparation of mustard (*Brassica juncea*) powder with retained pungency and reduced bitterness. *LWT - Food Sci Tech.* 49: 42–47.
- [3] Megeji N.W., Kumar J.K., Singh V., Kaul V.K., Ahuja P.S. 2005. Introducing Stevia rebaudiana, a natural zero-calorie sweetener. *Current Science*, 88(5): 801-804.
- [4] Ortiz-Viedma J., Romero N., Puente L., Burgos K., Toro M., Ramírez L., Rodríguez A., Barros-Velázquez J., Aubourg S.P. 2017. Antioxidant and antimicrobial effects of stevia (*Stevia rebaudiana Bert.*) extracts during preservation of refrigerated salmon paste. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 119: 1-9.
- [5] Tsai F.H., Kitamura Y., Kokawa M. 2017. Liquid-core alginate hydrogel beads loaded with functional compounds of radish by-products by reverse spherification: Optimization by response surface methodology. *Int. J. Bio. Macromol.* 96: 600-610.
- [6] Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colourimetry of total phenolics with phospomolobdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vit.* 16: 144–158.
- [7] Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Tech.* 28: 25–30.

[8] Benzie I.F., Strain J.J. 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Method Enzymol.* 299:15–27.

[9] Yu L., Gao B., Wang T.T.Y., Luo Y., Wang J., Yu L.L. 2018. Home food preparation techniques impacted the availability of natural antioxidants and bioactivities in kale and broccoli. *Food Funct.* 24:585-593.

[10] Bernhardt S., Schlich E. 2005. Impact of different cooking methods on food quality: retention of lipophilic vitamins in fresh and frozen vegetables. *J. Food Eng.* 17: 327–333.

[11] Castillejo N., Martínez-Hernández G.B., Mónaco K., Gómez P.A., Aguayo E., Artés F., Artés-Hernández F. 2017. Preservation of bioactive compounds of a green vegetable smoothie using short time-high temperature mild thermal treatment. *Food Sci. Technol. Int.* 23: 46-60.

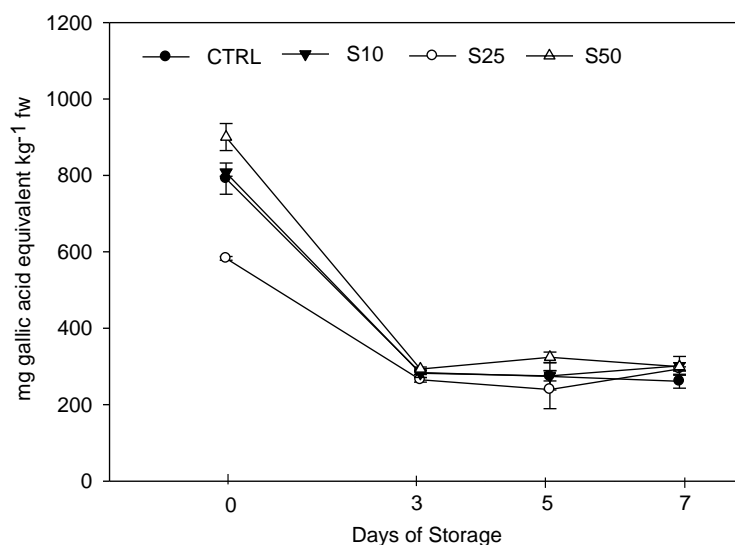


Figure 1: Total phenolic compounds of kale juice spheres with stevia during 7 days at 5 °C.

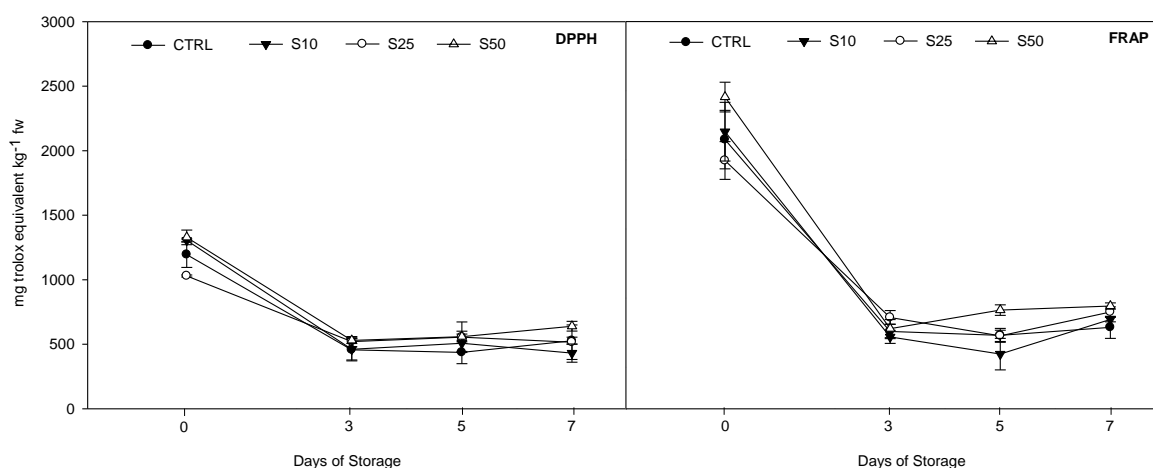


Figure 2: Total antioxidant capacity by DPPH and FRAP assay of kale juice spheres with stevia during 7 days at 5 °C.

Influence of the refrigerated storage temperature on shelf life of seabream fillets

Influencia de la temperatura de conservación en refrigeración sobre la vida útil de filetes de dorada

L. Navarro-Segura^{1*}, M. Ros-Chumillas¹, A. López-Gómez¹

¹Food Engineering and Agricultural Equipment Department, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena, Spain.

* laura.navarro@upct.es

Abstract

The consumption of sea bream (*Sparus aurata*) fillets has increased in recent years because of its healthy products with minimal processed. However, its shelf life is relatively short. The objective of this study was to extend the shelf life of minimally processed sea bream fillets analyzing the influence of the storage temperature on its quality. A surface decontamination treatment was carried out on the fillets with oregano essential oil nanoemulsion and then, were packaged in modified atmosphere and stored at 1, 2 and 4°C. The microbiological and physical-chemical parameters carried out suggest that the optimum temperature of preservation of this product is 2°C, since it temperature extend its shelf life up to 28 days and decontaminated fillets improves the sensory quality and reduces microbial growth and N-TMA values.

Keywords: *Sparus aurata*; quality; shelf life; essential oils; nanoemulsion.

Resumen

El consumo de dorada (*Sparus aurata*) fileteada se ha incrementado estos últimos años por ser un producto saludable con una mínima preparación para su consumo. Sin embargo, su vida útil es relativamente corta. El objetivo de este estudio fue alargar la vida útil de filetes de dorada mínimamente procesados analizando la influencia de la temperatura de conservación sobre su calidad. Se realizó un tratamiento de descontaminación superficial de los filetes con nanoemulsión de aceite esencial de orégano frente a uno control, ambos fueron envasados en atmósfera modificada y conservados a 1, 2 y 4°C. Los análisis microbiológicos y físico-químicos realizados mostraron que la temperatura óptima de conservación de este producto es de 2°C ya que consigue alargar su vida útil hasta 28 días y que los filetes descontaminados con nanoemulsión mejoraron la calidad sensorial al obtener un crecimiento microbiano y un valor de N-TMA menor que los filetes control.

Palabras clave: *Sparus aurata*; calidad; vida útil; aceites esenciales; nanoemulsión.

1. INTRODUCCIÓN

La dorada (*Sparus aurata*) es una de las especies de acuicultura más importantes en los países mediterráneos y su producción se ha visto incrementada durante esta última década. Los consumidores demandan productos que requieren una preparación mínima y que sean a su vez saludables y apetecibles debido al ritmo de vida actual. Es por ello que el consumo de pescado en filetes se ha incrementado estos últimos años [1].

Por otro lado, la vida útil de un pescado fileteado es bastante corta ya que es un producto bastante perecedero debido principalmente al deterioro microbiológico. Mediante tecnologías emergentes de descontaminación superficial con agentes antimicrobianos naturales, como son los aceites esenciales, en combinación con el envasado en atmósfera modificada (MAP) se puede extender su conservación en refrigeración [2,3]. Según estudios realizados, los tratamientos aplicados con nanoemulsiones de aceites esenciales han tenido resultados efectivos contra gran variedad de microorganismos debido a sus excelentes propiedades antimicrobianas [4].

El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de diferentes temperaturas de conservación en refrigeración sobre la calidad y vida útil de filetes de dorada envasados en MAP con una descontaminación superficial previa.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Se tomaron doradas (*Sparus aurata*) frescas procedentes de acuicultura (suministradas por la empresa Servicios Atuneros del Mediterráneo, S.L.), con un peso medio de unos 500 g cada una. El procesado de las doradas se realizó en una sala blanca clase 10000 a 12°C que a su vez contiene una cabina de flujo laminar (clase 100). Se realizaron dos tratamientos, Tratamiento Control: los filetes fueron introducidos en barquetas (0,75 L) y envasados en la máquina Efaman de Efabin, con una atmósfera modificada de 70% N₂ – 30% CO₂, las barquetas se conservaron a 1, 2 y 4°C. *Tratamiento con Nanoemulsión de orégano (NAEO)*: los filetes fueron sumergidos en un baño de agua con nanoemulsión de orégano al 0,1% durante 2 minutos y escurridos durante 30 segundos. Posteriormente los filetes fueron envasados y conservados en las mismas condiciones que el tratamiento control.

2.2 Determinación microbiológica

Para el análisis microbiológico, 25 g de muestra se diluyeron en 225 mL de agua peptonada (Scharlau, Barcelona) en bolsas estériles de Stomacher para ser homogeneizadas en Stomacher durante 1 minuto. Los análisis se realizaron por triplicado. Los microorganismos alterantes del pescado que se estudiaron fueron: areobios mesófilos (AMT) y psicrófilos totales, bacterias ácido lácticas (BAL), *Enterobacteriaceae spp.*, y *Pseudomonas spp.*

2.3 Parámetros físico-químicos

Los parámetros se analizaron de la siguiente manera. Para el pH, se tomaron 5 g de dorada, los cuales se mezclaron con 10 mL de agua destilada y se sometió a agitación, tras ello se procedió a la medición del pH con un pH-metro Basic 20 (Crison). El Color se determinó mediante un colorímetro (Minolta CR300) obteniéndose los valores de luminosidad (L*), coordenadas rojo/verde (a*) y amarillo/azul (b*) según el sistema CIELAB. Para la textura, se cortó la muestra en cuadrados de 2-3 cm de lado y se utilizó un texturómetro TA-XT plus (Stable Micro Systems) con una sonda cilíndrica de compresión de 50 mm de diámetro para realizar un análisis de perfil de textura (TPA). La capacidad de retención de agua (CRA) se determinó expresando el porcentaje de agua que queda retenida en el músculo de pescado. Para la determinación de N-TMA, se utilizó el método propuesto por Dyer [5]. Posteriormente, se midió la absorbancia de la muestra a 410 nm mediante un espectrofotómetro (Zuzi 4110RS) y se calculó el nitrógeno trimetilamina (N-TMA) en 100 g de pescado con referencia a una curva patrón.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis microbiológico

Observando los resultados obtenidos en el análisis microbiológico (Fig. 1) podemos concluir que todos los microorganismos estudiados presentan un crecimiento menor en los filetes conservados a 1 y 2°C que los conservados a 4°C para ambos tratamientos. Por otra parte, los filetes descontaminados con nanoemulsión presentan una inhibición del crecimiento de los microorganismos frente al tratamiento control durante el periodo de almacenamiento. De esta manera, encontramos que los filetes descontaminados y almacenados a menor temperatura disminuyen el recuento de microorganismos entre 0,5 y 1,5 log UFC/g con respecto al control para *Enterobacteriaceae spp.* y aerobios mesófilos y psicrófilos totales aumentando su vida útil hasta los 28 días. En el caso de *Pseudomas spp.*, el tratamiento con nanoemulsión inhibe el crecimiento total hasta los 21 días de conservación para los filetes almacenados a 1 y 2°C con respecto a los filetes control y los conservados a 4°C de ambos tratamientos.

3.2 Parámetros físico-químicos

Se observó que los valores de pH, color, textura y CRA se mantuvieron muy constantes durante todo el periodo de almacenamiento independientemente del tratamiento realizado y de la temperatura de conservación (representaciones no mostradas). Los valores obtenidos para pH se encontraron entre 6,3 y 6,6; para el color, los parámetros L*, a* y b* fueron similares a los obtenidos por Masniyom [6]. Los valores de dureza, que representan la textura en los filetes, son muy similares y siguen una leve tendencia a disminuir durante el período de conservación. Al final del periodo de almacenamiento los valores de CRA se mantuvieron en un rango del 70-80%, considerado para pescado fresco según Campus [7]. En cambio, los resultados obtenidos de N-TMA (Tabla 1), fueron similares entre tratamientos, pero se observaron diferencias entre las temperaturas de conservación donde la temperatura de 4°C fue la que mostró valores considerablemente mayores que la de 1 y 2°C.

4. CONCLUSIONES

Los filetes descontaminados con NAEO y envasados en MAP en combinación con el uso de temperaturas de almacenamiento de 1 y 2°C, consiguen un menor deterioro y degradación que se pone de manifiesto por el bajo valor de N-TMA obtenido. De esta manera, aplicando este sistema de envasado junto con una temperatura de conservación de 2°C, se consigue retrasar el crecimiento microbiológico en *Pseudomonas*, BAL y *Enterobacteriaceae* entre 21 y 28 días. Lo que nos permite alargar la vida útil en 7 días con respecto al envasado control. De acuerdo con la Legislación Vigente que determina el valor máximo de los parámetros que establecen la calidad del pescado, y los resultados obtenidos, se puede establecer que la temperatura de almacenamiento que consigue una mejor conservación de los filetes es la temperatura de 2°C.

5. AGRADECIMIENTOS

Se quiere agradecer a la empresa Pescados de Acuicultura de Murcia S.L. (Pescamur) por su contribución en esta investigación que forma parte del Proyecto de I+D financiado por el CDTI.

6. REFERENCIAS

[1] Garrido M.D., Hernández M.D., Espinosa M.C., López M.B. 2014. Enhanced quality characteristics of refrigerated seabream (*Sparus aurata*) fillets packed under different systems (Modified atmosphere vs Vacuum). J. Aquat. Food Prod. T. 25: 156-168.

[2] Attouchi M., Sadok S. 2012. The effects of essential oils addition on the quality of wild and farmed sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. *Food Bioprocess Tech.* 5(5): 1803-1816.

[3] Baydar, H., Sagdic, O., Ozkan, G., Karadogan, T. 2004. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control.* 15:169-172.

[4] Zhang, Z., Vriesekoop, F., Yuan, Q., Liang, H. 2014. Effects of nisin on the antimicrobial activity of D-limonene and its nanoemulsion. *Food Chem.* 150:307-312.

[5] AOAC. 1990. Association of Official Analytical Chemist.

[6] Masniyom, P., Benjakul, S., Visessanguan, W. 2005. Combination effect of phosphate and modified atmosphere on quality and shelf-life extension of refrigerated seabass slices. *LWT - Food Sci Tech.* 38: 745-756.

[7] Campus, M., Addis, M.F., Cappuccinelli, R., Porcu, M.C., Pretti, L., Tedde, V., Secchi, N., Stara, G., Roggio, T. 2010. Stress relaxation behaviour and structural changes of muscle tissues from Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.) following high pressure treatment. *J. Food Eng.* 96:192-198.

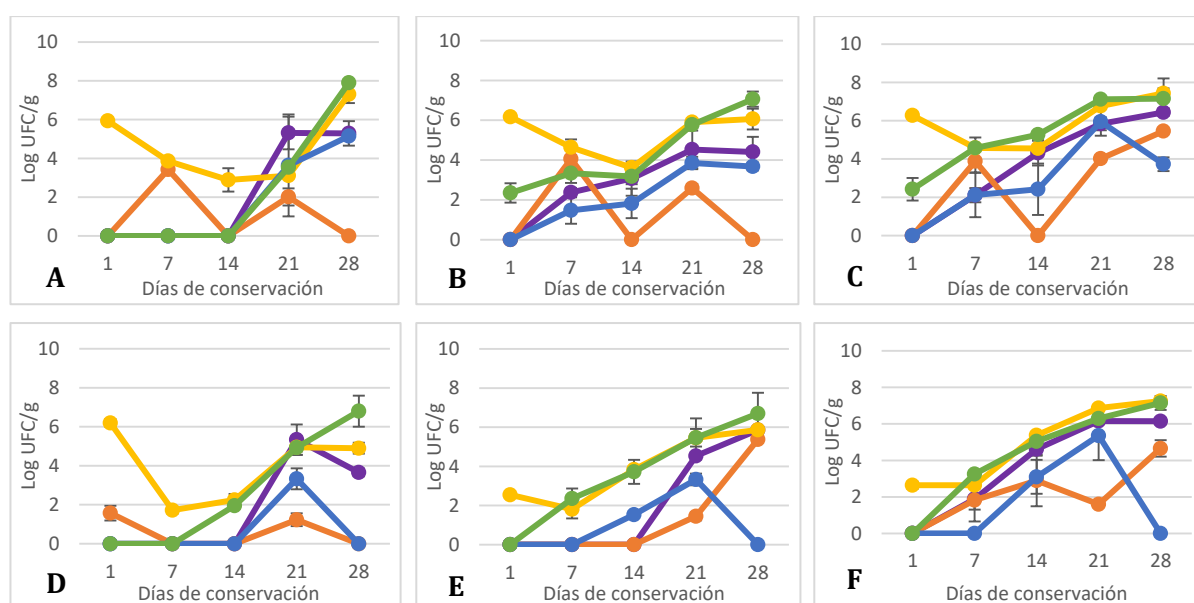


Figura 1. Recuentos (Log UFC/g) de microorganismos alterantes en filetes de dorada control (A, B y C) y descontaminados con nanoemulsión de orégano (D, E y F) almacenados a 1, 2 y 4°C, respectivamente. *Enterobacteriaceae spp* (morado), BAL (naranja), AMT (amarillo), *Pseudomonas ssp.* (azul) y Psicrófilos (verde). Las barras verticales representan la desviación estándar (SD).

Tabla 1. Evolución del N-TMA (mg/100g) en filetes de dorada control y descontaminados con nanoemulsión de orégano durante su conservación a 1, 2 y 4°C (media \pm SD, n=3).

Parámetros	Tratamiento	Tª	1	7	14	21	28
N-TMA	Control	1°C	0,42 \pm 0,07	0,25 \pm 0,12	0,27 \pm 0,10	0,84 \pm 0,12	1,12 \pm 0,39
		2°C	0,22 \pm 0,14	0,13 \pm 0,04	0,35 \pm 0,31	1,37 \pm 0,36	1,72 \pm 0,07
		4°C	0,66 \pm 0,14	0,30 \pm 0,12	1,13 \pm 0,53	2,35 \pm 0,11	3,31 \pm 0,79
	Nanoemulsión Orégano	1°C	0,39 \pm 0,21	0,28 \pm 0,02	0,44 \pm 0,13	0,63 \pm 0,01	0,90 \pm 0,03
		2°C	0,43 \pm 0,09	0,27 \pm 0,08	0,25 \pm 0,12	1,31 \pm 0,57	1,48 \pm 0,15
		4°C	0,64 \pm 0,34	0,23 \pm 0,18	0,51 \pm 0,10	2,25 \pm 0,52	3,25 \pm 1,59

Quality changes of fresh-cut faba bean seeds processed under different sanitizers

Cambios en la calidad de semillas de haba mínimamente procesadas tratadas con diferentes desinfectantes

E. Collado^{1*}, F. Artés-Hernández^{1,2}, E. Aguayo^{1,2}, F. Artés^{1,2}, P. A. Gómez¹

¹Institute of Plant Biotechnology. Universidad Politécnica de Cartagena. Campus Muralla del Mar. 30202. Cartagena, Spain.

²Postharvest and Refrigeration Group. Department of Food Engineering. Universidad Politécnica de Cartagena. P^o Alfonso XIII, 48. 30203. Cartagena, Spain.

*elenacolladomarin@hotmail.com

Abstract

Faba beans (*Vicia faba*) are high in proteins and rich in energy with important health promoting minerals, dietary fiber, vitamins and antioxidants. In addition, today's lifestyle, with little time to prepare balanced meals and the increased interest in healthy food, has driven demand for natural, fresh, ready-to-eat vegetable products. To maintain the beneficial properties of these products is necessary to optimize the processing and preservation methods. According to that, the production of minimally processed immature legume seeds would be an alternative to promote the consumption of vegetables. The effects of sanitation with NaOCl (150 ppm) or alternatively with ascorbic acid (AA) (0.05 mol L⁻¹) or lemon juice (LJ) (30 ml 100 mL⁻¹) and storage at 1°C or 4°C on sensory attributes (overall quality, taste, appearance and browning), total phenolic content and antioxidant capacity were analyzed. Storage at 1°C extends the shelf life of minimally processed immature seeds stored under MAP conditions respect to storage at 4°C. Different disinfectant not affect to total phenolic content and antioxidant capacity.

Keywords: *Vicia faba*; NaOCl; ascorbic acid; lemon juice.

Resumen

Las habas (*Vicia faba*) tienen un alto contenido proteico y energético y son una fuente de minerales, fibra, vitaminas y antioxidantes. Además, el estilo de vida actual, con poco tiempo para preparar comidas equilibradas, y el creciente interés por una alimentación sana, ha llevado a una demanda de productos naturales, frescos y listos para consumir. Para mantener el efecto beneficioso de estos productos es necesario optimizar su procesado y los métodos de conservación. Por ello, la producción de semillas de habas inmaduras mínimamente procesadas sería una alternativa para promover su consumo. En este estudio se analizaron los efectos de la desinfección con NaOCl (150 ppm) o alternativamente con ácido ascórbico (AA) (0,05 mol L⁻¹) o con zumo de limón (ZL) (30 ml 100 mL⁻¹), y la conservación a 1 y 4°C, sobre la calidad sensorial (calidad general, apariencia visual, sabor y pardeamiento) y el contenido en fenoles totales y capacidad antioxidante. El almacenamiento a 1°C prolongó la vida útil de las habas mínimamente procesadas bajo condiciones de MAP respecto al almacenamiento a 4°C. Los diferentes desinfectantes no afectaron al contenido en fenoles totales y a la capacidad antioxidante.

Palabras clave: *Vicia faba*; NaOCl; ácido ascórbico; zumo limón.

1. INTRODUCCIÓN

Las habas contienen 22.4-36% de proteína, 57.8-61% de carbohidratos, 12% de fibra y 1.2-4% de lípidos [1]. Asimismo, Baginsky et al. [2] reportó un importante contenido fenólico y de capacidad antioxidante en semillas de haba. Para fomentar el consumo de legumbres, una de las soluciones que se plantean es el desarrollo de productos mínimamente procesados o de IV gama, listos para consumir.

La desinfección es uno de los pasos más críticos en la elaboración de productos de IV gama. La industria ha utilizado ampliamente el hipoclorito de sodio (NaOCl) por su actividad antimicrobiana y su bajo coste [3]. Sin embargo, es cuestionado debido a la formación de subproductos tóxicos. Como alternativa al NaOCl, la desinfección con ácido ascórbico o con zumo de limón podría ser eficaz.

El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos del lavado con NaOCl (100 ppm, pH 6,5) o alternativamente con o alternativamente con ácido ascórbico (AA) (0.05 mol L⁻¹, pH 2.75) o con zumo de limón (ZL) (30 ml 100 mL⁻¹, pH 2.5), y la conservación a 1 y 4°C, sobre la calidad organoléptica y el contenido en fenoles totales y capacidad antioxidante de semillas de habas frescas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Procesado, envasado, almacenaje y microondado

El material vegetal (habas variedad Palencia) se recolectó en el mes de enero de 2015. Las muestras fueron transportadas bajo condiciones de refrigeración al laboratorio, manteniéndolas en oscuridad a 1°C y con una humedad relativa de 90-95%. Al día siguiente las habas se pelaron manualmente en una sala desinfectada y climatizada a 8°C y se administraron los distintos tratamientos de desinfección: (1) Inmersión durante 2 min en NaOCl (150 ppm, pH 6.5), y enjuague con agua fría durante 1 min; (2) Inmersión durante 2 min en ácido ascórbico (0.05 mol L⁻¹, pH 2.75), y enjuague con agua fría durante 1 min.; (3) Inmersión durante 2 min en zumo de limón (30 ml 100 mL⁻¹, pH 2.5), enjuague con agua fría durante 1 min. Se envasaron 125 g en bolsas (15x15 cm) de OPP (50 µm φ). Una vez termoselladas se almacenaron a 1 y 4°C. Se prepararon 5 repeticiones por tratamiento y día de evaluación.

2.2 Evaluación sensorial

La evaluación sensorial la realizó un panel de siete personas (de 24 a 50 años) entrenadas en este tipo de análisis, de acuerdo con las normas internacionales (ASTM STP 913 1986). Se calificó una escala hedónica de 9 puntos para los síntomas visuales de pardeamiento (9=ausencia, 5=presencia moderada, 1=presencia severa) y para el resto de parámetros tales como aspecto visual, sabor y calidad general (1=no comestible; 5=límite de comerciabilidad; 9=excelente).

2.3 Contenido en fenoles totales

El contenido en fenoles totales fue analizado según el método desarrollado por Singleton and Rossi. [4] con algunas modificaciones. Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de ácido gálico por 100 g⁻¹ de producto fresco. Se analizaron 3 réplicas por tratamiento y temperatura.

2.3 Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante (CAT) fue analizada por el método FRAP [5]. Los resultados fueron expresados en mg trolox 100 g⁻¹ de producto fresco. Se analizaron 3 réplicas por tratamiento y temperatura.

2.4. Análisis estadístico

El análisis de varianza (ANOVA) se realizó comparando los diferentes tratamientos, tiempo de almacenamiento y temperatura de conservación a un nivel significativo de $P \leq 0.05$ utilizando PASW Statistics 23 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Evaluación sensorial

Durante el almacenamiento se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) en la puntuación de los diferentes parámetros sensoriales (Fig. 1), tanto en muestras almacenadas a 1°C como a 4°C. Las muestras conservadas a 4°C mostraron una vida útil reducida (3 días) con respecto a las muestras conservadas a 1°C (7 días). Las semillas almacenadas a 1°C mostraron una mayor calidad general, apariencia visual y sabor que las conservadas a 4°C, sin diferencias significativas entre los tratamientos. De hecho, las muestras almacenadas a 4°C estaban por debajo del límite de comercialización para estos parámetros desde el día 3 de conservación.

3.2 Contenido en fenoles totales

El contenido en fenoles totales se redujo durante el almacenamiento, siendo la concentración menor en el producto conservado a 4°C (Fig. 2). Las muestras conservadas a 1°C mostraron reducciones de alrededor del 35%, 40% y 45% en las muestras tratadas con NaOCl, AA y ZL, respectivamente, mientras que las muestras conservadas a 4°C tuvieron menores reducciones, de alrededor del 30% en todos los tratamientos. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos en diferentes leguminosas donde el almacenamiento disminuyó el contenido en fenoles totales [6]. Esto podría deberse a las estresantes condiciones durante el procesamiento.

3.2 Capacidad antioxidante total

Se observaron valores de FRAP similares entre los diferentes desinfectantes y temperaturas, sin cambios significativos (Fig. 2). La CAT se redujo durante el almacenamiento, siendo la concentración menor en el producto conservado a 4°C. Las muestras conservadas a 1°C mostraron reducciones de alrededor del 30% en todos los tratamientos, mientras que las muestras conservadas a 4°C tuvieron reducciones del 43%, 32% y 22% en las muestras tratadas con NaOCl, AA y ZL, respectivamente. Esto está en concordancia con estudios previos [7] donde se registró una ligera disminución de la actividad antioxidante en las muestras de brócoli, independientemente de los tratamientos, durante el tiempo de almacenamiento.

4. CONCLUSIONES

El uso de ácido ascórbico o de zumo de limón podría ser una alternativa a la utilización de NaOCl, ya que se obtienen resultados similares en contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante a los obtenidos con el hipoclorito. El almacenamiento a menor temperatura permitió la obtención de un producto de alta calidad hasta aproximadamente el día 7 de almacenamiento, momento a partir del cual la calificación sensorial disminuyó en gran parte debido al pardeamiento de las semillas.

5. AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto EUROLEGUME financiado por fondos de la Unión Europea dentro del 7º Programa Marco de Investigación, Desarrollo Tecnológico y Diseminación, acuerdo Nª 613781, por la financiación recibida.

6. REFERENCIAS

- [1] Hedley C. 2001. Carbohydrates in Grain Legume Seeds. Improving Nutritional Quality and Agronomic Characteristics. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- [2] Baginsky C., Peña-Neira A., Cáceres A., Hernández T., Estrella I., Morales H., Pertuzé R. 2013. Phenolic compound composition in immature seeds of faba bean (*Vicia faba* L.) varieties cultivated in Chile. *J. Food Compos. Anal.* 31: 1-6.
- [3] Artés F., Gómez P., Aguayo E., Escalona V., Artés-Hernández F. 2009. Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. *Postharvest Biol. Technol.* 51: 287-296.
- [4] Singleton V.L., Rossi J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. *J. Enol. Vitic.* 16: 144-158.
- [5] Benzie I.F., Strain J.J. 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* 299: 15-27.
- [6] Anurag R.K., Manjunatha M., Narayan J.S., Kumari L. 2016. Storage quality of shelled green peas under modified atmosphere packaging at different storage conditions. *J. Food Sci. Technol.* 53: 1640
- [7] Nath A., Bagchi B., Misra L.K., Deka B.C. 2011. Changes in post-harvest phytochemical qualities of broccoli florets during ambient and refrigerated storage. *Food Chem.* 127:1510-1514.

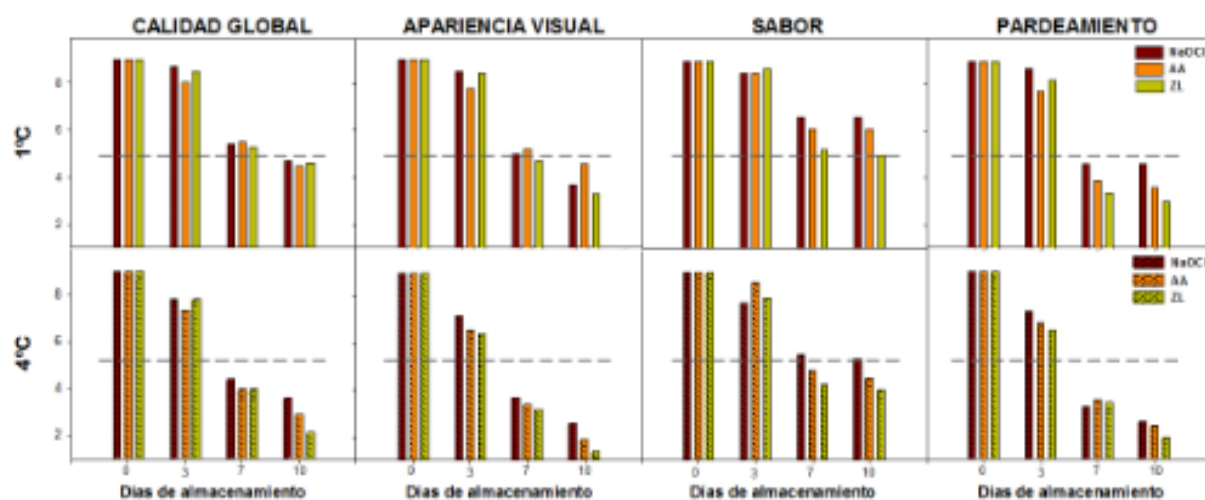


Figura 1. Efecto de los distintos tratamientos y temperaturas en la calidad sensorial de habas almacenadas en atmósfera modificada (NaOCl: hipoclorito sódico, AA: ácido ascórbico, ZL: zumo limón).

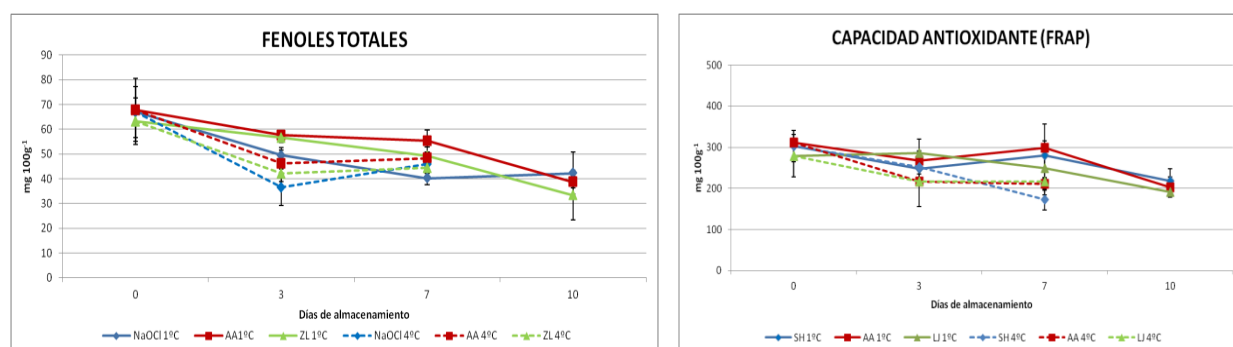


Figura 2. Efecto de los distintos tratamientos y temperaturas en la evolución del contenido en fenoles totales y capacidad antioxidante en habas almacenadas en atmósfera modificada (NaOCl: hipoclorito sódico, AA: ácido ascórbico, ZL: zumo limón). Las líneas enteras representan los valores a 1°C y las punteadas los valores a 4°C).

Study of the FTase activity of different commercial enzymes for the production of scFOS

Estudio de la actividad FTasa de diferentes enzimas comerciales para la producción de scFOS

M.J. Sánchez-Martínez^{1*}, S. Soto-Jover¹, A. López-Gómez¹

¹Food Engineering and Agricultural Equipment Department, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, 30203 Cartagena, Spain.

*mjose.sanchez@upct.es

Abstract

Fructooligosaccharides (FOS) are oligosaccharides consisting of linear chains of β (2 \rightarrow 1)-linked fructose with a terminal D-glucose. The production of scFOS by enzymatic hydrolysis of sucrose is carried out by specific fructosyltransferase (FTase) enzymes, but this process is expensive due to the price of these enzymes. Therefore, it is interesting to search for enzymes with FTase activity that are present in the market with other enzymatic activities and have a lower price. Allowing the production of FOS at industrial level with a lower production cost, the FOS will have a lower price in the market.

Keywords: Fructooligosaccharides; Fructosyltransferase; Enzymatic hydrolysis.

Resumen

Los fructooligosacáridos (FOS) son oligosacáridos que consisten en cadenas lineales de D-fructosa con enlaces β (2 \rightarrow 1), que presentan una molécula de D-glucosa terminal. La producción de scFOS mediante hidrólisis enzimática de la sacarosa se realiza mediante enzimas fructosiltransferasas (FTasas) específicas, pero este proceso es caro debido al elevado precio de estas enzimas. Por ello, en este trabajo se realiza una búsqueda de enzimas con actividad FTasa que están presentes en el mercado con otras actividades enzimáticas y tienen un precio menor. Esto permitirá la producción de FOS a nivel industrial con un menor coste de producción y una reducción del precio de los scFOS en el mercado.

Palabras clave: Fructooligosacáridos; Fructosiltransferasa; Hidrólisis enzimática.

1. INTRODUCCIÓN

Existe una fuerte tendencia de mercado por el consumo de alimentos y bebidas funcionales con prebióticos y probióticos, y desde hace ya algunos años la industria alimentaria se ha centrado en la adición de fructooligosacáridos (FOS) a bebidas y alimentos [1, 5] por su carácter prebiótico [3]. Los FOS son carbohidratos no digeribles, y químicamente son cadenas lineales de D-fructosa unidas por enlaces β (2 \rightarrow 1), con una molécula de D-glucosa terminal unida por un enlace α (2 \rightarrow 1) [4]. Los FOS pueden ser producidos mediante dos vías: por hidrólisis de la inulina y mediante transformación enzimática de la sacarosa. Para su aplicación a nivel industrial encontramos que para la hidrólisis de inulina se usan ácidos orgánicos y altas temperaturas, lo cual implica un alto coste y produce residuos y emisiones contaminantes [8]. Este trabajo se centra en la síntesis enzimática de FOS por transfructosilación de sacarosa a través de la ruptura de los enlaces glucosídicos β (2 \rightarrow 1) y la transferencia de la fracción fructosil a una sacarosa o un FOS.

Este proceso es realizado por las enzimas β -D-fructofuranosidasas (FFasas, EC 3.2.1.26) o transfructosilasas (FTasas, EC 2.4.1.9) [2], dando lugar a FOS de cadena corta (scFOS) que son una mezcla de oligosacáridos que contienen una glucosa unida a unidades de fructosa formando los scFOS: 1-kestosa (GF₂), 1-nistosa (GF₃) y 1-fructofuranosil-nistosa (GF₄) [6,7,9]. Esta vía también tiene alto coste debido al precio de las enzimas FTasas específicas que existen en el mercado. Así, una alternativa es usar preparaciones enzimáticas comerciales de bajo coste, presentes en la industria alimentaria [10], que se comercializan para otra actividad enzimática principal, pero que además presentan actividad FTasa como actividad secundaria. En este estudio se han analizado diferentes preparaciones enzimáticas comerciales de uso común en la industria alimentaria para comparar su actividad FTasa.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Enzimas estudiadas

Las enzimas comerciales con una posible actividad FTasa estudiadas son las denominadas en este trabajo como Enzima (A), Enzima (B), Enzima (C) y Enzima (D), todas del proveedor Novozymes (Dinamarca).

2.2 Producción de scFOS a partir de preparaciones enzimáticas comerciales

Las enzimas (A), (B) y (C) fueron usadas para la producción de FOS según la metodología descrita por Paulino y Zúniga-Hansen (2012). Se partió de tres soluciones azucaradas diferentes, 40, 50 y 60 °Brix con pH 5,5 ajustado con ácido cítrico 0.1 N y se adicionaron 2 mL de enzima por cada 100 g de solución azucarada. La mezcla bien agitada se incubó a 50°C en un baño a 30 rpm. Además, se realizó una comparación de la producción de scFOS mediante la enzima (A) y la enzima (D), para una solución azucarada de 60°Brix (con pH 5.5, ajustado mediante ácido cítrico 0.1N), con una concentración enzimática de 1 mL/100 g de solución azucarada, también bajo unas condiciones de incubación de 50 °C y 30 rpm. Las muestras tomadas en distintos tiempos de reacción se sometieron a una inactivación térmica mediante un calentamiento en baño con agua a 100 °C. Todos los ensayos se realizan por triplicado.

2.3. Determinación de azúcares simples y scFOS mediante cromatografía líquida

Para la determinación de azúcares simples y scFOS se ha utilizado un UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) con detector de índice de refracción, con las siguientes características: Cromatógrafo Shimadzu UPLC LC- 30AD system; con columna Asahipak NH2P-50 4E Shodex (Waters); con fase móvil de acetonitrilo-agua (68:32), flujo 1 mL/min, 30 °C en la columna, volumen de inyección de 10 μ L, 20 minutos de análisis y una temperatura del índice de refracción de 45 °C.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Producción de scFOS a partir de la Enzima (A)

La enzima (A) se comercializa por su actividad pectinasa, pero también tiene actividad FTasa, como se puede observar en la Figura 1 A, donde la enzima muestra un rendimiento de producción de FOS máximo del 70% entre las 6,5 y 8,5 horas de incubación, para la concentración azucarada de 60 °Brix, esto nos indica que la solución de sacarosa más concentrada favorece la actividad FTasa. La mayor velocidad de síntesis de FOS se observa para la solución azucarada menos concentrada, 40 °Brix, al inicio de la reacción (Figura 1 B), mientras que las otras dos concentraciones mantienen la velocidad más constante. En el caso del estudio realizado por Vega-Paulino y Zúniga-Hansen [10], donde también se comprueba la actividad FTasa de la enzima (A),

para una concentración de 536 g/L de sacarosa, se obtiene un rendimiento máximo del 61,1 % en 12 horas de fermentación enzimática.

3.2. Producción de scFOS a partir de la Enzima (B) y (C)

La enzima (B) tiene como actividad principal degradar la lactosa en glucosa y galactosa. Según se puede observar en la Figura 2, la enzima (B) no tiene una buena actividad FTasa, con producciones de scFOS inferiores al 4 % y con grandes desviaciones. La enzima (C) tiene como actividad principal degradar la sacarosa en glucosa y fructosa, es una invertasa, y no se presentan resultados de producción de FOS porque tras 10 horas de ensayo no se detectaron scFOS en la composición del medio de reacción. Sin embargo, Vega-Paulino y Zúniga-Hansen [10] con esta enzima (C) obtuvieron 10,5 g FOS/100 g de sacarosa, partiendo de 536 g/L de sacarosa.

3.3. Comparación de la producción de scFOS mediante (A) y (D)

En la comparación de las enzimas (D) y (A) ambas producen altas concentraciones de FOS, alcanzando un 65-70 % (g FOS /g solución de sacarosa inicial) sin diferencias significativa (Figura 3 A), pero en la Figura 3 B podemos observar que la velocidad de generación de glucosa es mucho mayor en las primeras horas de reacción con la enzima (A). La enzima (D), según Vega-Paulino y Zúniga-Hansen [10] da lugar a una producción de 58,8 g FOS/ 100 g sacarosa inicial en 12 horas de reacción, pero nosotros alcanzamos con esa enzima una producción de 70 g FOS/100 g sacarosa en 48 horas de reacción enzimática.

4. CONCLUSIONES

De las preparaciones enzimáticas comerciales estudiadas sólo la (A) y la (D) poseen una alta actividad FTasa, con un rendimiento de transformación de la sacarosa en FOS similar comprendido entre el 60-70 %. El resto de las preparaciones enzimáticas estudiadas no son adecuadas para la síntesis de FOS a partir de la sacarosa.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del Proyecto CDTI (ref. IDI-20141129), llevado a cabo en colaboración con la empresa Zukan S.L., que financia la realización de estas investigaciones y la beca otorgada a M.J. Sánchez para la realización de su tesis doctoral.

6. REFERENCIAS

- [1] Flores-Maltos D.A., Mussatto S.I., Contreras-Esquivel J.C., Rodríguez-Herrera R., Teixeira J.A., Aguilar C.N. 2016. Biotechnological production and application of fructooligosaccharides. *Crit. Rev. Biotechnol.* 36: 259-267.
- [2] Maiorano A.E., Piccoli R.M., Da Silva E.S., de Andrade Rodrigues M.F. 2008. Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics. *Biotechnol. Lett.* 30: 1867-1877.
- [3] Mishra S., Mishra H.N. 2013. Effect of synbiotic interaction of fructooligosaccharide and probiotics on the acidification profile, textural and rheological characteristics of fermented soy milk. *Food Bioprocess. Technol.* 6: 3166-3176.
- [4] Ninness K. 1999. Breakfast foods and the health benefits of inulin and oligofructose. *Cereal Foods World*, 44: 79-81.
- [5] Renuka B., Kulkarni S.G., Vijayanand P., Prapulla S.G. 2009. Fructooligosaccharide fortification of selected fruit juice beverages: Effect on the quality characteristics. *LWT-Food Sci. Tech.* 42: 1031-1033.
- [6] Roberfroid M.B., Delzenne N.M. 1998. Dietary fructans. *Annu. Rev. Nutr.* 18: 117-143.
- [7] Sánchez O., Guio F., García D., Silva E., Caicedo L. 2008. Fructooligosaccharides production by *Aspergillus* sp. N74 in a mechanically agitated airlift reactor. *Food Bioprod. Process.* 86: 109-115.

[8] Tomotani E.J., Vitolo M. 2007. Production of high-fructose syrup using immobilized invertase in a membrane reactor. *J. Food Eng.* 80: 662-667.

[9] Vega R., Zúniga-Hansen M.E. 2014. A new mechanism and kinetic model for the enzymatic synthesis of short-chain fructooligosaccharides from sucrose. *Biochem. Eng. J.* 82: 158-165.

[10] Vega-Paulino R.J., Zúniga-Hansen M.E. 2012. Potential application of commercial enzyme preparations for industrial production of short-chain fructooligosaccharides. *J. Mol. Catal. B- Enzym.* 76: 44-51.

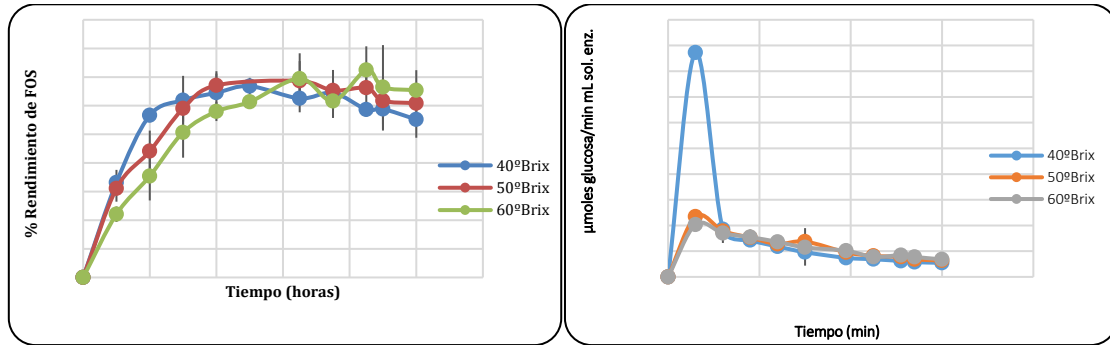


Figura 1. Rendimiento de producción de FOS (g FOS/g sacarosa *100) para 40, 50 y 60 °Brix mediante la enzima A a 50 °C y 30 rpm (izquierda); Glucosa (μmoles) generada por minuto y mL de enzima para 40, 50 y 60 °Brix a 50 °C y 30 rpm (derecha).

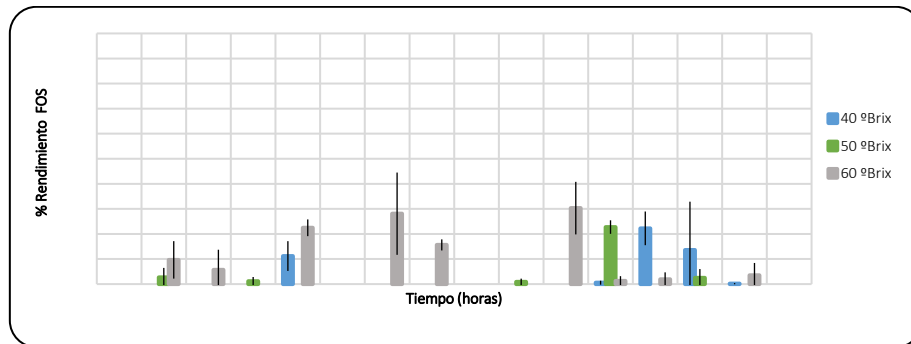


Figura 2. Rendimiento de producción de FOS (g FOS/g sacarosa *100) para 40, 50 y 60 °Brix mediante la enzima (B) a 50 °C y 30 rpm.

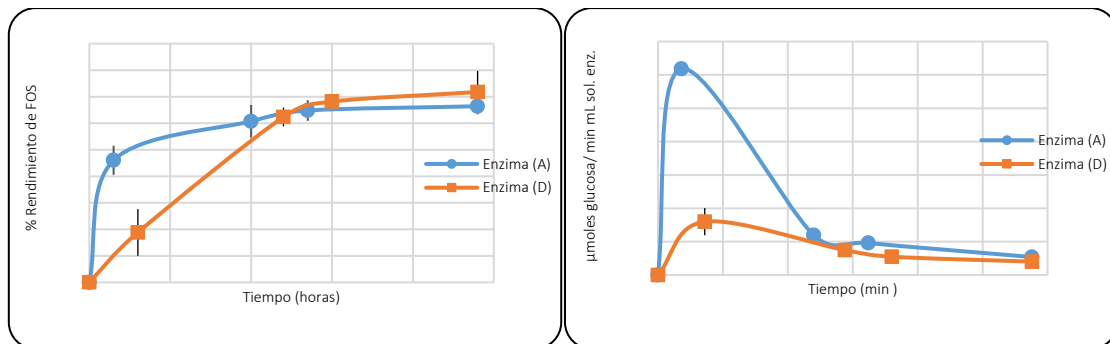


Figura 3. Rendimiento de producción de FOS (g FOS/g sacarosa*100) para las enzimas (A) y (D) (1 mL /100 g) en 60 °Brix, 50 °C y 30 rpm (izquierda); Glucosa (μmoles) generada por minuto y mL de enzima en 60 °Brix a 50 °C y 30 rpm (derecha).

In vitro response of *Penicillium ulaiense* to postharvest fungicides

Respuesta *in vitro* de *Penicillium ulaiense* a fungicidas poscosecha

M.A. Parra^{1*}, R. Pérez¹, J.A. Martínez¹

¹Grupo de Protección de Cultivos. Dpto. Producción Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, P^o Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena, Spain.

* ma.parra@upct.es

Abstract

Penicillium ulaiense is a pathogen of citrus fruits little known to date, since traditionally, pathogens belong to *Penicillium* sp. of citrus fruits have been identified as *P. digitatum* and *P. italicum*. However, *P. ulaiense* has been cited as a citrus pathogen since the 1980s in several countries, especially in Asia. The continuous development of fruits throughout the five continents increases the hypothesis that this species has expanded to Europe, including Spain. In fact, *P. ulaiense* has already been detected in our country. It is possible that it is widespread can be unnoticed due to this species is very similar to the classical *Penicillium* species which cause citrus decay, such as *P. digitatum* and *P. italicum*. In this work, growth of an isolate of this species is characterised and compared to *P. digitatum* and *P. italicum*. Likewise, the effect of the thiabendazole and pyrimethanil fungicides is studied. The results showed a very low growth rate and conidial dispersion of *P. ulaiense* colonies with regard to *P. digitatum* and *P. italicum*. This low activity could be translated into a higher control of conidia production by the use of the two fungicides tested.

Keywords: Thiabendazole; pyrimethanil; *Penicillium digitatum*; *Penicillium italicum*.

Resumen

Penicillium ulaiense es un patógeno de frutos cítricos poco conocido hasta la fecha, ya que tradicionalmente, los patógenos penicílicos de los agrios se han identificado como *P. digitatum* y *P. italicum*. Sin embargo, *P. ulaiense* ha sido citado como patógeno de los cítricos en varios países desde la década de los 80, especialmente asiáticos. El continuo devenir de frutas a lo largo de los cinco continentes, acrecienta la sospecha de que la especie se haya infiltrado en Europa y, particularmente en España. En efecto, *P. ulaiense* ya ha sido detectado en nuestro país, es posible que se encuentre extendido, y que sea el agente causal de bastantes podredumbres penicílicas, pero puede pasar desapercibido por su enorme semejanza visual con las especies clásicas. En este trabajo, se pretende caracterizar el crecimiento de esta especie y compararla con *P. digitatum* y *P. italicum*. Así mismo, se estudia el efecto de los fungicidas tiabendazol y pirimetanil. Los resultados denotaron una tasa de crecimiento muy baja y dispersión de colonias de *P. ulaiense*, respecto a *P. digitatum* y *P. italicum*. Esta menor actividad se pudo traducir en un mayor control de la conidiogénesis por el uso de los dos fungicidas ensayados.

Palabras clave: Tiabendazol; pirimetanil; *Penicillium digitatum*; *Penicillium italicum*.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades más comunes y más graves de los frutos cítricos son los mohos verdes y azules, causados por *P. digitatum* y *P. italicum* respectivamente [1]. Sin embargo, se ha descrito *P. ulaiense* en otros países [2,3,4]. Tenemos constancia de que esta última especie se ha introducido ya en España, por lo que podría estar causando podredumbres que pueden pasar desapercibidas debido al extraordinario parentesco que tiene la podredumbre con las ocasionadas por las especies clásicas de *Penicillium* en cítricos. Fenotípicamente, *P. ulaiense* se puede diferenciar de *P. digitatum* y *P. italicum* por la presencia de sinemas o coremios que se forman principalmente en medio de cultivo sintético.

El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar la patogenicidad de esta especie, y comprobar la efectividad de los fungicidas comúnmente utilizados contra *P. digitatum* y *P. italicum* en el control de este hongo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Origen de los aislados

El aislado de *P. ulaiense* fue suministrado en octubre de 2017 por la empresa Citrosol (Valencia; Spain). Fue obtenido de la microbiota de frutos cítricos producidos en esta comunidad. Los aislados de *P. digitatum* y *P. italicum* datan del año 2015 y son almacenados en la colección MAPYS (Microorganismos de la Agricultura, Poscosecha y Sostenibilidad) del Grupo Protección de Cultivos de la UPCT.

2.2. Aplicación de los postulados de Koch y desarrollo del hongo en agar-albedo

Se inocularon 4 limones maduros en una herida realizada con un punzón hasta alcanzar el albedo con 10 µL de una suspensión de conidios para cada hongo, se mantuvieron a 25°C y una humedad relativa del 90 a 95%. Después de 15 días, se desarrollaron síntomas y signos en la fruta inoculada con *Penicillium ulaiense*. El agente causal se volvió a aislar y caracterizar a nivel fenotípico, demostrando características propias de la especie y, por tanto, se confirmaron los postulados de Koch.

2.3. Tratamiento *in vitro* con los fungicidas tiabendazol y pirimetanil

Se preparó una batería de placas en medio de cultivo sintético de agar de patata de dextrosa (PDA Scharlab®, Barcelona) con los fungicidas Textar 60-T (60% p/v) y DECCO PYR (40% p/v) a diluciones sucesivas desde (10⁻¹ a 10⁻⁶). Se sembraron 4 placas para cada dilución y hongo, *Penicillium ulaiense* y los aislados de *Penicillium digitatum* y *P. italicum* [5].

Se determinó diariamente el área de crecimiento de la colonia (cm²), tasa de crecimiento (cm²/día), masa de micelio(g) y conidiogénesis (conidios/cm²), de acuerdo con Parra y Martínez (2016) [6]. En este trabajo se presentan los resultados correspondientes al crecimiento y efecto de los fungicidas sobre la conidiogénesis.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tasa de crecimiento de *P. ulaiense* fue significativamente inferior a la *P. digitatum* y *P. italicum*, ocupando el 9,6% del total de la placa para el día final del ensayo, *P. italicum* colonizó completamente la placa a partir del tercer día, mientras que *P. digitatum* mantuvo un crecimiento hasta completar el total de la placa el noveno día (Fig. 1). Esta diferencia tan elevada se debió a que *P. ulaiense* mostró una menor capacidad de dispersión de conidios por la placa de cultivo, de tal manera que el crecimiento cuantificado se redujo exclusivamente al de la colonia original. Este resultado demuestra una menor capacidad de dispersión de esta especie y, por tanto, un menor

riesgo de contaminación en cámara. Posiblemente, el mayor efecto de los fungicidas probados sobre esta especie se deba a su menor esporulación.

En *Penicillium* es común la dispersión del hongo a partir de la germinación de conidios producidos por la propia colonia principal, debido a la elevada tasa de conidiogénesis que presenta, ya que se trata de un hongo seco y pulverulento. Esto desemboca en la formación de colonias satélite en cultivos sintéticos que podrían interferir en el desarrollo de la colonia principal [6].

El tiabendazol fue más efectivo contra la esporulación de los aislados de *Penicillium*. El mayor efecto contra la esporulación de estos aislados se obtuvo con este fungicida. Se detectó crecimiento de las colonias y esporulación para la dilución (10^{-5}) (Fig. 2a), mientras que para el pirimetanil ya se obtuvo en la dilución (10^{-1}) (Fig 2b). *P. ulaiense* mostró valores similares de esporulación para las diluciones (10^{-5} y 10^{-6}), en ambos fungicidas (Fig. 2a, 2b). A la dosis más diluida, el tiabendazol redujo más del 50% la esporulación de *P. digitatum* y *P. italicum* frente al pirimetanil.

4. CONCLUSIONES

Los fungicidas tiabendazol y pirimetanil pueden ser utilizados para el control de *Penicillium ulaiense*, reduciendo la esporulación del hongo y por lo tanto su dispersión, con una mayor efectividad que para controlar a *P. digitatum* o *P. italicum*, especialmente con el uso de tiabendazol.

5. AGRADECIMIENTOS

A la empresa S.A.T. 9821 GRUPO CFM, por la financiación de este trabajo. A CITROSOL, especialmente a Celia Murciano, por el suministro e identificación del aislado de *P. ulaiense*. Finalmente, a Pablo Crespo de DECCÓ IBÉRICA por la entrega de DECCO PYR (pirimetanil).

6. REFERENCIAS

- [1] Plaza P., Usall J., Teizidó N., Viñas I. 2003. Effect of water activity and temperature on germination and growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum* and *Geotrichum candidum*. J. Appl. Microbiol. 94: 549-554.
- [2] Tashiro N., Manabe K., Ide Y. 2012 First report of whisker mold, a postharvest disease on citrus caused by *Penicillium ulaiense* (in Japan). J. Gen. Plant Pathol. 78: 140-144.
- [3] Khan A., Subhani M.N., Chatta M.B., Anwar W., Nawaz K. 2017. First report of whisker mold of citrus (*Citrus sinensis*) caused by *Penicillium ulaiense* in Pakistan. Plant Disease. 101: 1042.
- [4] Rouissi W., Cherif M., Ligorio A., Ippolito A., Sanzani S.M. 2015. First report of *Penicillium ulaiense* causing whisker mould on stored citrus fruit in Tunisia. J. Plant Pathol. 97: 402.
- [5] Pérez E., Blanco O., Berreta C., Dol I., Lado J. 2011. Imazalil concentration for *in vitro* monitoring of imazalil resistant isolates of *Penicillium digitatum* in citrus packinghouses. Postharvest Biology and Technology. 6: 258-262.
- [6] Parra, M.A., Martínez, J.A. 2016. Phenotypic variability and pathogenicity of different isolates of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* obtained from lemon fruits (*Citrus limon* (L.) Burm.) En: Proceedings of the 5th Workshop on Agri-Food research WiA-16. Editores: F. Artés-Hernández, J.A. Fernández-Hernández, J. Calatrava, E. Aguayo, J.J. Alarcón, J.E. Cos. Editorial: CRAI Biblioteca, Universidad Politécnica de Cartagena, Murcia, España. ISBN: 978-84-16325-29-0. 130-133. 223 pp. <http://hdl.handle.net/10317/5558>.

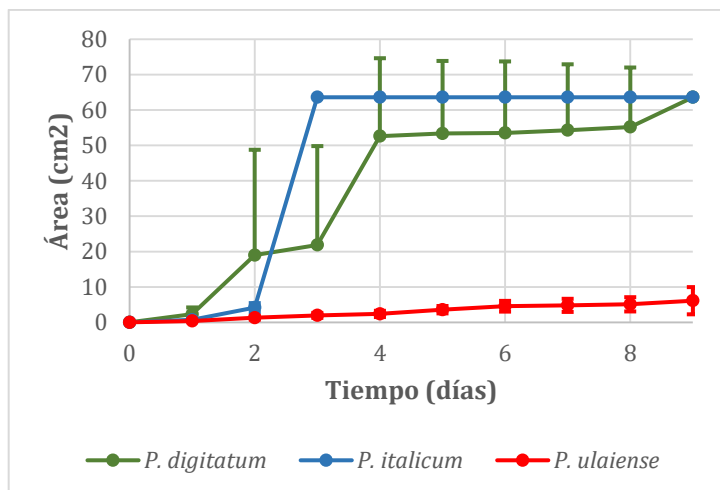


Figura 1. Curvas de cinética de crecimiento y dispersión de conidios de *Penicillium digitatum*, *P. italicum* y *P. ulaiense*, creciendo en PDA a 26°C.

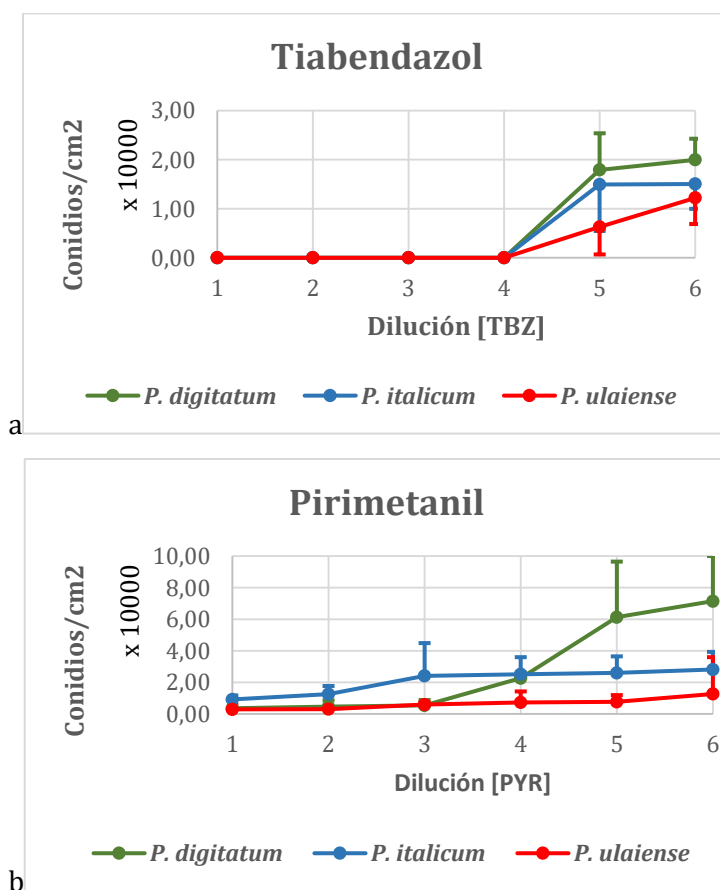


Figura 2. Efecto de los fungicidas tiabendazol (a) y pirimetanil (b) sobre la conidiogénesis de los diferentes aislados de *Penicillium* en diluciones decimales sucesivas de la materia activa, creciendo en PDA a 26°C.

ORAL SESSION II:

Plant Production Technology
and Engineering

Improvement of yield and quality fruit in water stressed through selection of pepper rootstocks

Mejora del rendimiento y calidad en déficit hídrico mediante selección de portainjertos de pimiento

A. Gálvez^{1*}, F. Pérez-Alfocea², F. M. del Amor¹, J. López-Marín¹

¹Hortofruticultura, IMIDA (Instituto Murciano de I+D Agrario y Alimentario). C/ Mayor s/n La Alberca. 30150 -Murcia, Spain.

² Nutrición Vegetal, CEBAS-CSIC. Campus de Espinardo, 25. 30100 -Murcia, Spain.

* 1297@coitarm.es

Abstract

The reduction of the water available in the southeastern Spanish is forcing to look for alternatives that alleviate these decreases. The effects of three commercial rootstocks (Atlante, Creonte and Terrano) on the agronomical and physiological responses of a commercial sweet pepper variety (cv Herminio) subject to deficit irrigation (50% of field capacity) have been studied. Although the three rootstocks increased total and marketable yield under control and deficit irrigation. Creonte produced the most productive and efficient plants in the use of water, recorded the highest photosynthetic activity and water content in the leaves, and the foliar area and biomass more stable under water stress. Atlante is a vigorous vegetative rootstock and Terrano is rather a dwarfing-reproductive rootstock that produces efficient compact plants without negative effects on fruit quality.

Keywords: *Capsicum annuum* L.; grafting; vegetative growth; vigour; drought.

Resumen

La reducción del agua disponible en el Sureste español está obligando a buscar alternativas que palien dichas disminuciones. En este trabajo se han estudiado los efectos de tres portainjertos comerciales (Atlante, Creonte y Terrano) sobre la respuesta agronómica y fisiológica de una variedad comercial de pimiento (cv Herminio) sometido a riego deficitario (50% de la capacidad de campo). Creonte produjo las plantas más productivas y eficientes en el uso del agua, registró la mayor actividad fotosintética y contenido de agua en las hojas, y el área foliar y la biomasa más estables bajo estrés hídrico. Atlante es un portainjerto vegetativo vigoroso y Terrano es más bien un portainjerto enano-reproductivo que produce plantas compactas eficientes sin efectos negativos en la calidad de la fruta.

Palabras clave: *Capsicum annuum* L.; injerto; desarrollo vegetativo; vigor; sequía.

1. INTRODUCCIÓN

En un futuro próximo, la mayor necesidad de alimentos, derivada del esperado aumento de la población mundial y la mejora de su calidad de vida, conducirá a una mayor demanda de agua para regar los cultivos y aumentará más la competencia por éste cada vez más escaso recurso. Los efectos del estrés hídrico pueden ser directos: como la disminución de la disponibilidad de CO₂ causada por las limitaciones de difusión a través de los estomas y/o el mesófilo [1]; o por alteración en las reacciones de fijación de CO₂ [2]. Una solución posible para reducir las pérdidas

de rendimiento y mejorar el crecimiento de los cultivos en condiciones de déficit hídrico, implica el uso de injertos con portainjertos capaces de paliar los efectos de este estrés en el tallo [3,4]. La obtención de conocimientos sobre los rasgos fisiológicos/agronómicos de los portainjertos disponibles ciertamente contribuirá a una mejor selección de los portainjertos adecuados para cada agroambiente.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el comportamiento de tres portainjertos comerciales de pimiento sobre el equilibrio vegetativo/reproductivo, el intercambio de gases y el rendimiento y calidad de la producción de pimiento injertado cultivado en régimen de riego normal y régimen de riego deficitario.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal y condiciones del invernadero

El cultivar 'Herminio' F1 (Syngenta Seeds, EE.UU.) se injertó sobre tres portainjertos comerciales: Atlante (Ramiro Arnedo, Spain), Terrano (Syngenta Seeds, USA) y Creonte (De Rooter, Monsanto Seeds, Holanda). Se utilizaron plantas de 'Herminio' no injertadas como control. El ciclo de cultivo se inició el 5 enero y finalizó el 16 de agosto. La densidad de plantación fue de 25.000 plantas/ha. El tratamiento control (sin estrés: NS) recibió el 100% de los requerimientos de riego (ETc), mientras que el tratamiento de estrés hídrico (estrés: S) recibió el 50% de la cantidad del tratamiento control. El diseño experimental fue un diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones para cada condición de riego. El tratamiento de estrés hídrico se inició a los 181 días después del trasplante (DDT) y se mantuvo durante 30 días.

2.2 Desarrollo vegetativo, intercambio gaseoso y producción

Se seleccionaron 15 plantas injertadas y no injertadas para medir diferentes parámetros individualmente. Al final del ciclo de cultivo (211 DDT), se midieron los valores de altura de la planta, área foliar y peso fresco (PF) y seco (PS) de hojas, tallos y raíces. Se midió el área foliar utilizando un medidor de hoja y se extrajo la biomasa de la raíz en un volumen de suelo similar a 40 x 40 x 40 cm³ en todas las plantas. Para determinar el intercambio gaseoso, se midieron las hojas más cercanas a un fruto recién cuajado y las medidas se efectuaron 20 días después del cuajado del mismo (205 DDT), de 9:00 am a 11:00 am (GMT). La tasa de asimilación neta de CO₂ (Amax, $\mu\text{mol de CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$), la conductancia estomática (gs, $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), y la tasa de transpiración (E, $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) se midieron en condiciones constantes de saturación de luz (800 $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y 400 ppm de CO₂ con un medidor de fotosíntesis portátil LI-6400 (LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska, EE.UU.). Se recolectaron los frutos de pimiento de las 15 plantas seleccionadas y se evaluó la producción, diferenciando entre total, comercial y destrío (soleados, blossom-end-rot, etc.).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Creonte fue el mejor portainjertos en cuanto al rendimiento total y comercial (Tabla 1) y algunos parámetros físicos de calidad de los frutos (dimensiones y firmeza del fruto) en ambos tratamientos, control y particularmente deficitario (Tabla 1). Además, este portainjertos incrementa significativamente los parámetros relacionados con la fotosíntesis (Fig.1.A), el índice de cosecha y la eficiencia del uso del agua agronómica (Fig. 1. E,F), en comparación con Herminio sin injertar y los otros portainjertos. Aunque Creonte registró la mayor biomasa de raíz en condiciones control, este patrón fue el más afectado por el estrés hídrico en este parámetro. Sin embargo, Atlante presentó el mayor sistema radicular en ambas condiciones de cultivo, indujo la mayor biomasa de hojas y tallos (Fig. 2.A) y altura de la planta, pero sin un efecto adicional significativo en el rendimiento de la producción. Por lo tanto, Atlante puede ser considerado como

un portainjertos vegetativo, mientras que Creonte es más bien de tipo reproductivo (alta relación reproductiva/vegetativa) (Fig. 2.C). Las plantas injertadas en Terrano fueron más compactas y registraron el mayor WUEi (uso eficiente del agua intrínseco) bajo déficit hídrico, pero produjeron un rendimiento similar a Atlante y mayor que Herminio no injertado a pesar de los bajos valores de Amax y gs (Fig. 1A, B). Estos resultados sugieren requerimientos de agua mucho menores para este portainjertos enano/reproductivo. Creonte proporcionó tolerancia al estrés hídrico, a través del mantenimiento del área foliar y de los parámetros relacionados con la fotosíntesis, como ocurrió en estrés térmico [5].

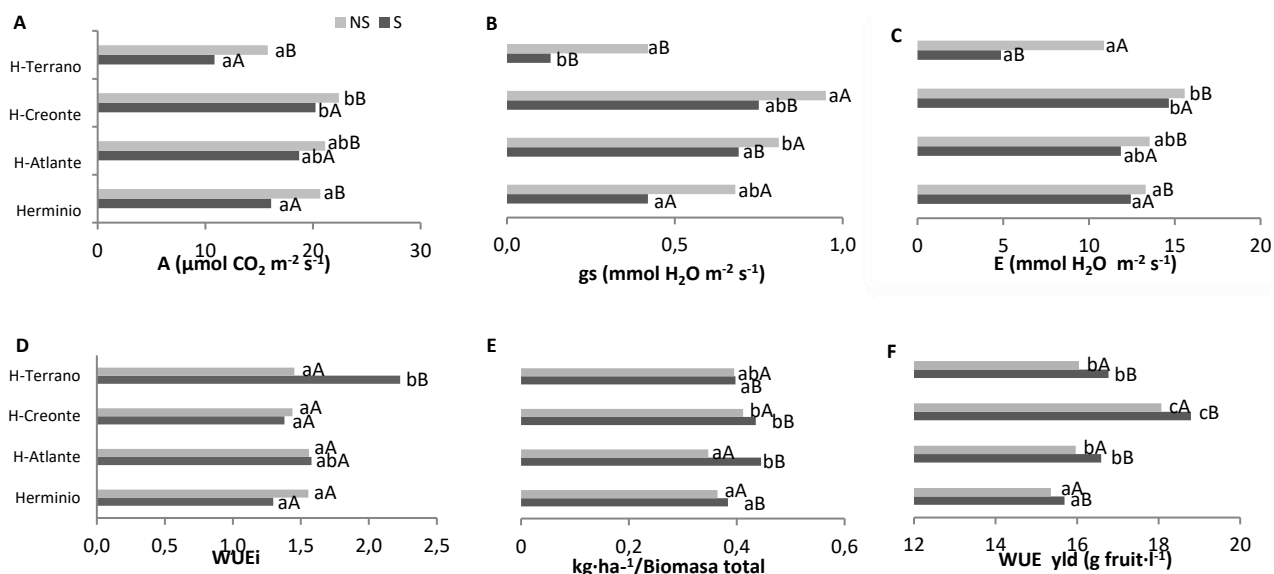
En general, el injerto promueve el crecimiento vegetativo debido al mayor y más vigoroso sistema radicular de los portainjertos [6], sin embargo, no existe interrelación entre la producción y el vigor de las plantas proporcionadas por el portainjertos en pimiento [7], como ocurre en este estudio. Un sistema de raíces más desarrollado ayudaría a explicar plantas más vigorosas, particularmente bajo déficit hídrico, pero no parece ocurrir en este estudio, ya que la biomasa de la raíz en el portainjertos más productivo Creonte fue la que se vio más afectada (Fig. 4d). Creonte es claramente un portainjertos de tipo reproductivo; los rasgos más importantes de este portainjertos están relacionados con la alteración de la fisiología foliar en la variedad, ya que esta combinación de injertos registró los más altos valores y estabilidad de los parámetros relacionados con la fotosíntesis, como se observó previamente bajo estrés térmico [5].

4. CONCLUSIONES

En conclusión, el vigoroso y vegetativo portainjertos Atlante no proporciona ningún beneficio en términos de rendimiento de frutos o resistencia a la sequía. Creonte es un portainjertos reproductivo que proporciona mayor fotosíntesis neta, área foliar estable y mayores rendimientos (tanto por el número de frutos como por el peso) en ambos regímenes de riego sin afectar a la estructura vegetativa de la variedad injertada. Terrano es un portainjertos enano-reproductivo que reduce principalmente la altura de la planta sin afectar a la biomasa de los tallos y aumenta el rendimiento WUE intrínseco y la producción comercial bajo ambos regímenes de riego, conservando las características claves de la calidad del fruto.

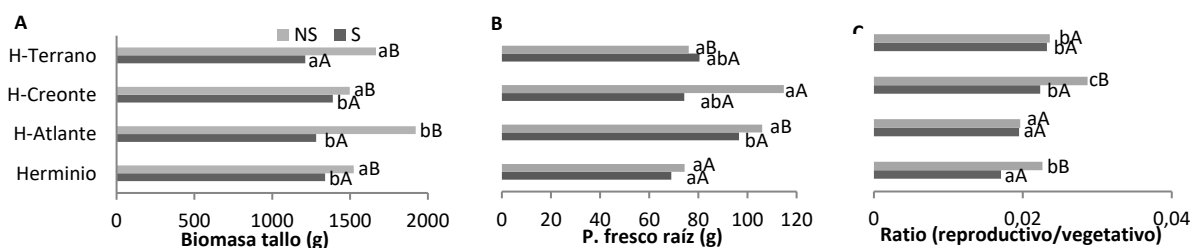
5. REFERENCIAS

- [1] Flexas, J., Díaz-Espejo, A., Galmés, J., Kaldenhoff, R., Medrano, H., Ribas-Carbo, M. 2007. Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO₂ concentration around leaves. *Plant Cell Environ.* 30:1284-1298.
- [2] Lawlor, D.W., Cornic, G. 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ.* 25: 275-294.
- [3] Schwarz, D., Roupael, Y., Colla, G., Venema, J.H. 2010. Grafting as a tool to improve tolerance of vegetables to abiotic stresses: Thermal stress, water stress and organic pollutants. *Sci. Hort.* 127: 162-171.
- [4] Albacete A, Martínez-Andújar C, Martínez-Pérez, A., Thompson, A.J., Dodd, I.C., Pérez-Alfocea, F. 2015. Unravelling rootstock×scion interactions to improve food security. *J. Exp. Bot.*: 66: 2211- 2226.
- [5] López-Marín, J., González, A., Pérez-Alfocea, F., Egea-Gilabert, C., Fernández, J.A., 2013. Grafting is an efficient alternative to shading screens to alleviate thermal stress in greenhouse-grown sweet pepper. *Sci. Hort.* 149: 39-46.
- [6] Lee, J.M., Kubota, C., Tsao, S.J., Bie, Z., Hoyos Echevarria, P., Morra, L., Oda, M. 2010. Current status of vegetable grafting: diffusion, grafting techniques, automation. *Sci. Hort.* 127: 93-105.
- [7] Doñas-Uclés, F., Pérez-Madrid, D., Amate-Llobregat, C., Rodríguez-García, E.M., Camacho-Ferre, F. 2015. Production of pepper cultivar palermo grafted onto serrano de morelos 2, jalapeño, and three commercial rootstocks. *HortScience.* 50 (7): 1018-1022.



Las diferentes mayúsculas señalan diferencias significativas entre las condiciones hídricas y las letras minúsculas muestran diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba de LSD ($p < 0.05$).

Figura 1. A (Fotosíntesis), B (Conductancia estomática), C (Transpiración), D (WUEi), E (Índice de cosecha) y F (WUE) de tres combinaciones variedad/portainjertos (H-Terrano, H-Creonte y H-Atlante) y plantas de pimiento “Herminio” sin injertar bajo condiciones de estrés (S) y no estrés (NS)



Las diferentes mayúsculas señalan diferencias significativas entre las condiciones hídricas y las letras minúsculas muestran diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba de LSD ($p < 0.05$).

Figura 2. A (Biomasa tallo: PFH+ PFT), B (PFR), C (Ratio vegetativo/reproductivo).

Tabla 1. Parámetros físicos y de producción en condiciones de estrés (S) y no estrés (NS).

Parámetros	Condiciones	Herminio	H-Atlante	H-Creonte	H-Terrano
Peso (g)	S	105.16±11.03	109.36±16.13aA	123.70±26.90bA	106.94±7.19aA
	NS	135.45±8.63a	143.25±18.30aB	179.60±21.25bB	144.49±15.62aB
Largo (mm)	S	74.24±5.57aA	87.24±10.16aA	94.67±7.28bA	90.40±15.04bA
	NS	96.92±10.01a	96.64±7.74aB	102.42±12.14bA	102.18±14.06bB
Ancho (mm)	S	71.46±7.27aA	71.49±4.25aA	74.81±7.03bA	69.81±8.15aA
	NS	74.13±9.33aB	79.96±2.79aB	89.49±4.53bB	72.75±8.52aB
Firmeza ($\text{Kg}\cdot\text{cm}^{-2}$)	S	2.04±0.20aA	2.18±0.19bA	2.26±0.30bA	1.98±0.33aA
	NS	1.96±0.58aA	2.26±0.30bA	2.36±0.34bA	2.16±0.25aA
Producción total (kg plant^{-1})	S	3.49±0.16aA	3.69±0.14bA	4.18±0.16cA	3.73±0.11bA
	NS	3.80±0.15aB	3.95±0.12bB	4.47±0.14cB	3.97±0.14bB
Producción comercial (kg plant^{-1})	S	2.62±0.10aA	2.87±0.11bA	3.25±0.12cA	2.90±0.14bA
	NS	2.90±0.13aB	3.19±0.16bB	3.89±0.14cB	3.44±0.15bB
Frutos soleados (kg plant^{-1})	S	0.63±0.08bA	0.56±0.07bB	0.60±0.07bB	0.50±0.07aB
	NS	0.60±0.06bA	0.46±0.05aA	0.38±0.06aA	0.33±0.07aA

Las diferentes mayúsculas señalan diferencias significativas entre las condiciones hídricas y las letras minúsculas muestran diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba de LSD ($p < 0.05$).

ABA-overproduction response under salinity Respuesta a la sobreproducción de ABA en salinidad

A. Martínez-Pérez^{1*}, A. Ferrández-Ayela², A.B. Sánchez-García², A. Albacete¹, Z. Kevei³, L. Estellés³, F. Mohareb³, A. Thompson³, M. Gifford⁴, J.M. Pérez-Pérez³, F. Pérez-Alfocea¹, C. Martínez-Andújar¹

¹Dept. of Plant Nutrition, CEBAS-CSIC, Murcia, Spain.

²Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Elche, Alicante, Spain.

³Cranfield Soil and AgriFood Institute, Cranfield University, Cranfield, Beds, United Kingdom.

⁴Life Sciences, University of Warwick, Coventry, United Kingdom.

*ascen.mp@gmail.com

Abstract

With the aim of better understanding the influence of the plant hormone abscisic acid (ABA) in adaptation to saline irrigation, two independent transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.) lines, sp12 and sp5, overexpressing constitutively *NCED1* (the enzyme that catalyzes a key rate-limiting step in ABA biosynthesis) and the wild type Ailsa Craig, have been studied in experiments either i) as whole plants or ii) as rootstocks under control and salinity conditions. While *NCED* overexpression penalizes growth under control conditions, it minimized the effect of salinity (whole plants) or significantly improved plant growth and yield when used as rootstocks. The analysis of the root xylem sap revealed that the phenotypes resulting under the different conditions were difficult to explain in terms of ABA overproduction. With the aim of explaining these results, the expression of a set of hormone and stress associated genes (analysed by real time PCR) as well as a transcriptomic analysis (by using one-color microarray) were performed in roots. The results suggest that *NCED* overexpression seems to alter several signalling pathways leading to stress adaptive responses that could help to explain the observed phenotypes.

Keywords: Phytohormone; transgenic; gene expression; microarray.

Resumen

Con el fin de comprender la influencia de la fitohormona ácido abscísico (ABA) en la adaptación al riego salino, dos líneas transgénicas independientes de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), sp12 y sp5, que sobreexpresan constitutivamente el gen *NCED1* (codifica para la enzima que cataliza un paso limitante en la biosíntesis de ABA) y la variedad silvestre Ailsa Craig, se han estudiado en experimentos o bien i) como planta entera o ii) como portainjerto bajo condiciones control y de estrés salino. Aunque la expresión constitutiva de *NCED* disminuye el crecimiento bajo condiciones control, minimiza los efectos producidos por la sal (planta completa) y mejora significativamente el crecimiento cuando se usa como portainjerto. El análisis de la savia xilemática de raíz mostró que los fenotipos resultantes bajo las diferentes condiciones de cultivo eran difíciles de explicar en términos de sobreproducción de ABA. Para intentar explicar estos resultados se llevó a cabo un análisis de expresión de un conjunto de genes relacionados con hormonas y estrés mediante PCR cuantitativa, así como un estudio transcriptómico mediante microarrays en la raíz. Los resultados sugieren que la sobreexpresión de *NCED* parece alterar diversas rutas de señalización, derivando en una respuesta adaptativa al estrés que podría ayudar a explicar los fenotipos observados.

Palabras clave: Fitohormona; transgénico; expresión de genes; microarrays.

1. INTRODUCTION

Saline irrigation water can limit plant growth and development of greenhouse tomato crops grown in Mediterranean environments with the plant hormone abscisic acid (ABA) playing a key role in adaptation to abiotic stress. Overexpression of genes that respond to drought or salinity stress is an attractive approach for improving resistance in crops. The recent production of transgenic plants overexpressing ABA biosynthesis genes, specifically *NCED* (*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase) provides a new tool to investigate ABA's role in growth regulation, but the responses of these plants to salinity have not been characterized. Understanding the biochemical and physiological responses to salinity provides a framework to identify breeding targets for improving salt tolerance [1].

The aim of this work was to evaluate if the use of ABA-overproducing tomato plants could improve growth when they were used as rootstocks.

2. MATERIALS Y METHODS

The plant material used was the tomato wild-type *Solanum lycopersicum* L. cv Ailsa Craig (AC), and two independent ABA-overproducing transgenic lines, sp12 and sp5, overexpressing the *NCED1* gene expressed constitutively under the control of the *Gelvin* superpromoter [2]. Seeds of the 3 genotypes were sown in trays filled with a vermiculite moistened regularly with half-strength Hoagland's nutrient solution.

2.1 Short-term hydroponic experiments.

At the stage of 2-3 true leaves seedlings were transferred to a hydroponic culture by using 20 L plastic trays containing half-strength Hoagland nutrient solution. The growth chamber conditions were settle to 16-h day and 8-h night (photon flux density was $245 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and 50%-60% relative humidity. After 1 week of acclimatization in control conditions, plants seedlings were exposed to 0 and 100 mM NaCl added to the nutrient solution for 21 days. Shoot fresh weight were determined in 4 replicates for each genotype and salt treatment. Xylem sap was collected using a Scholander-type pressure chamber. Leaves and xylem sap were kept at -80°C prior to hormonal analyses. Hormone ABA concentrations were analyzed in the xylem sap and in the mature leaf by UHPLC-MS according to Albacete et al. (2008) [3]. Gene expression was analysed according to Ferrández-Ayela et al [4].

2.2 Long-term greenhouse experiments

Seed of AC, sp12 and sp5 were sown and grown as described in above, and used as rootstocks. A commercial cherry tomato variety, Sugar Drop -SD- (Unigenia, Murcia, Spain) was used as a scion. Grafting was performed using the splicing method at the two to three true leaf stages (3–4 weeks after sowing), as is common commercially, and the scion was attached at the first node of the rootstock. When the grafted plants were well established, they were cultivated in a semi-hydroponic system using sand as substrate under commercial greenhouse conditions during autumn-winter in Almería (Spain). Fertilizers and water were supplied by a drip fertirrigation system (as is common in commercial tomato production). From 40 days after transplanting, a low salinity treatment ($\text{EC} = 3.5 \text{ mS cm}^{-1}$) was applied for a period of 200 days. Shoot fresh weight were determined in 6 replicates for each genotype. Xylem sap was collected using a Scholander-type pressure chamber. Leaves and xylem sap were kept at -80°C prior to hormonal analyses. Hormone ABA concentrations were analyzed as described in 2.1. Transcriptomic analysis was performed according to Ferrández-Ayela et al. [4].

3. RESULTS AND DISCUSSION

NCED overexpression in the transgenic lines decreased growth under control conditions (Fig. 1A) by 32% and 44% in sp12 and sp5 respectively (compared to WT plants). The salinity treatment applied for 21 days significantly decreased shoot growth in all genotypes (Figure 1A) by 67%, 50% and 53% in WT, sp12 and sp5 respectively. Thus *NCED* overexpression decreased shoot biomass accumulation under control conditions, but maintained it under salt conditions. The decreased in growth was correlated with an increase in ABA according to bibliography [2]. Transgenic lines sp12 and sp5 showed higher ABA concentration, by 1.3 and 1.6-fold of the WT in leaf (Figure 1B), and by 2.2 and 4.3-fold of the WT in root xylem sap (Figure 1C). Salinity increased ABA concentration in all genotypes around 30% as an average (Figures 1B and 1C). The rise in ABA concentration under 100mM NaCl occurs within a day of salinity treatment [1, 3].

When the transgenic lines were used as rootstocks in long-term experiments (Figure 1D), shoot FW was higher by 2.1 and 1.8-fold of the WT for sp12 and sp5 respectively. However this increase in growth was not correlated with a rise in the ABA concentration in the leaf (Figure 1E) or in the leaf xylem sap (Figure 1F), notwithstanding *NCED* was overexpressed (Figure 2). *NCED* overexpression alters the expression of different genes (Table 1) involved in osmotic adjustment and stress protection (upregulation of *TAS14* and *AQP2*), ABA metabolism (downregulation of *ZEP1*, *AOO/FLL* and *CYP707A*) and other hormone associated genes (upregulation of *ACs1a* and *JA2*) which could be involved in the plant response to salinity. Further gene expression analysis in long-term experiments (data not shown) revealed similar results for some genes such as *TAS14* or *JA2*. A comprehensive analysis of physiological and transcriptomic data is currently ongoing to explain the root-ABA signalling mediated phenotypes observed.

4. CONCLUSIONS

The results of this study suggest that *NCED* overexpression and early ABA accumulation in tomato roots seems to alter several plant hormone metabolism and signalling pathways leading to local and systemic stress adaptive responses.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Andrew J. Thompson from Cranfield University, the *NCED* seeds set. This work was supported by CICYT-FEDER (project AGL2011-27996) and European Union's Seventh Framework Programme for research, technological development and demonstration under grant agreement no 289365 (ROOTPOWER project).

6. REFERENCES

- [1] Pérez-Alfocea, F., Albacete, A., Ghanem, M.E. and Dodd, I. (2010). Hormonal regulation of source-sink relations to maintain crop productivity under salinity: a case of root-to-shoot signalling in tomato. *Funct. Plant Biol.* 27, p.592-603.
- [2] Thompson, A.J., Mulholland, B.J., Jackson, A.C., McKee, J.M.T., Hilton, H.W., Symonds, R.C., Sonneveld, T., Burbidge, A., Stevenson, P. and Taylor, I.B. (2007). Regulation and manipulation of ABA biosynthesis in roots. *Plant Cell Environ.* 30, p.67-78.
- [3] Albacete, A., Ghanem, M.E., Martínez-Andújar, C., Acosta, M., Sánchez-Bravo, J., Martínez, V., Lutts, S., Dodd, I.C., Pérez-Alfocea, F. (2008). Hormonal changes in relation to biomass partitioning and shoot growth impairment in salinized tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *J Exp Bot* 59, p.4119-4131.
- [4] Ferrández-Ayela, A., Sánchez-García, A.B., Martínez-Andújar, C., Kevei, Z., Gifford, M.L., Thompson, A.J., Pérez-Alfocea, F., Pérez-Pérez, J.M. (2016). Identification of stress-responsive biomarkers from gene expression data sets in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Funct. Plant Biol.* Accepted.

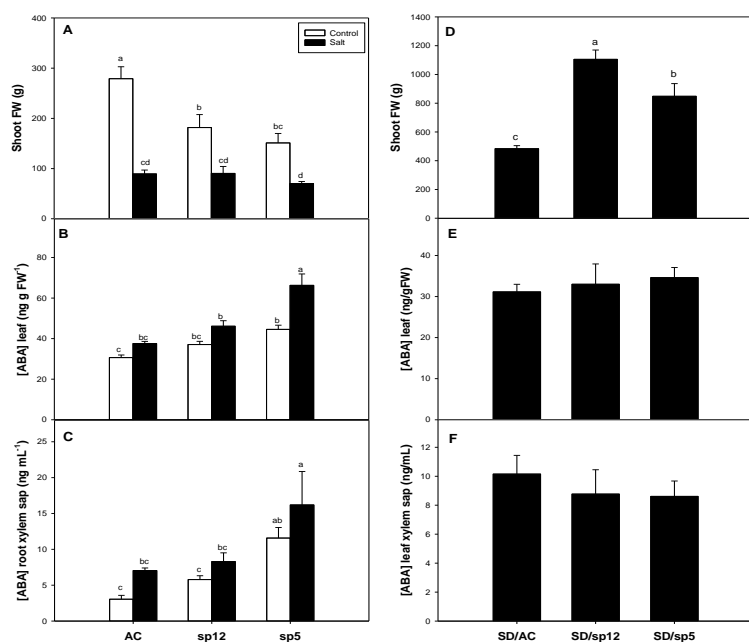


Figure 1. Final shoot FW (A), ABA concentration in the leaf (B) and in the root xylem sap (C) of the WT and the two transgenic lines after 21 days of hydroponic culture under control and salinity (100 mM NaCl) treatment. Final shoot FW (D), ABA concentration in the leaf (E) and in the leaf xylem sap (F) of grafted tomato plants with AC, sp12 and sp5 as rootstocks grown in a commercial greenhouse for 200 days under 3.5dS/m salinity treatment. Data are means \pm SE of 4-5 replicates. Letters above bars indicate significant differences as determined by Tukey pair-wise analysis.

Table 1. Gene expression in roots of AC and sp12 tomato plants grown hydroponically under control and salinity (100mM NaCl) during 11 days

Description	Gene annotation	Relative gene expression			
		WT		sp12	
		Control	Salt	Control	Salt
Osmotic adjustment	<i>TAS14</i>	1	70	3	94
	<i>AQP2</i>	1	3.2	2.5	3.2
ABA metabolism, homeostasis and signalling	<i>ZEP1</i>	1	3	0.8	1.5
	<i>AAO/FLC</i>	1	7.4	3	2
	<i>CYP707A</i>	1	251	1.5	2.5
Ethylene and JA metabolism	<i>ACs1a</i>	1	18.4	1	31.8
	<i>JA2</i>	1	285	122	300

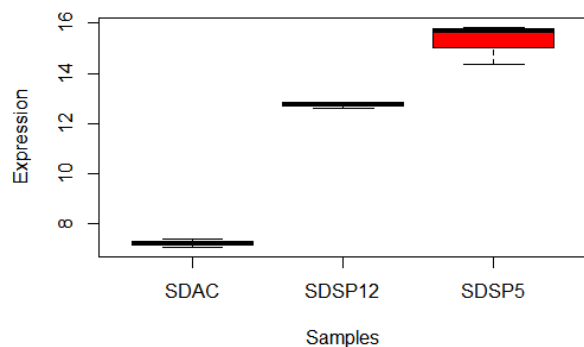


Figure 2. Expression values of Solyc07g056570.1.1, corresponding to *LeNCED1* gene in roots of grafted plants cultivated in commercial greenhouse for 200 days under 3.5 mS/cm EC

Comparing the impacts of drip irrigation by freshwater and reclaimed wastewater on the soil microbial community of two citrus species.

Comparación de los impactos del riego localizado con agua del Trasvase o agua regenerada sobre la comunidad microbiana del suelo en dos especies de cítricos.

J. Abadía^{1,2*}, F. Bastida¹, E. Nicolás²

¹ Grupo de Enzimología y biorremediación de suelos y residuos orgánicos CEBAS-CSIC, Campus Universitario de Espinardo, CP 30100 PO Box 164, Murcia, Spain.

² Departamento de Riego. CEBAS-CSIC, Campus Universitario de Espinardo, CP 30100 PO Box 164, Murcia, Spain.

*jabadia50@hotmail.com

Abstract

The search for new water resources for irrigation is a mandatory requirement in Mediterranean agroecosystems. The impacts of irrigation with water from different origins were evaluated in the soil microbial community and plant physiology of grapefruit and mandarin trees in the south-east of Spain. The following treatments were considered: i) freshwater from the Tajo-Segura water transfer canal and well (TW) ii) reclaimed water from a wastewater treatment plant (RW) iii) irrigation with TW, except in the second stage of fruit development when RW_c was applied iv) irrigation with RW, except in the second stage of fruit development when TW_c was applied. Enzyme activities and phospholipids fatty acids were determined to know the phylum of microbial biomass.

Keywords: Enzyme activities; semiarid, plant physiology.

Resumen

La búsqueda de nuevos recursos para el riego es un requerimiento en los agro ecosistemas mediterráneos. Se evaluó el impacto del riego con aguas de distintos suministros sobre la comunidad microbiana del suelo y sobre la fisiología de la planta en cultivos de pomelo y mandarino en el Sureste de España. Se consideraron los siguientes tratamientos: i) Agua procedente del Trasvase Tajo-Segura y de pozo (TW) ii) Agua regenerada procedente de una EDAR de la zona (RW) iii) Riego con TW, excepto en la segunda fase de desarrollo del fruto en la que se regó con RW_c iv) Riego con RW, excepto en la segunda fase de desarrollo del fruto en la que se regó con TW_c.

Palabras clave: Actividades enzimáticas; semiárido; fisiología de planta.

1. INTRODUCCIÓN

In Mediterranean regions, water availability is predicted to decrease in the coming decades. The region of Murcia, located in the South-east of Spain, is characterized by a deficit of water resources that reaches 400 Hm³ in the hydrographic basin (PHCS, 2016). In these conditions farmers needs to use non-conventional water resources for irrigation and reclaimed water from a wastewater plant is a feasible option for agriculture. This water has the problem of containing

an excess of salt that may increase the electrical conductivity and the risk of soil salinization [1] and conversely has available sources of organic matter that could improve the productivity in agricultural areas. Hence, irrigation with combined wastewater and freshwater can be an adequate solution to the problems commonly related to wastewater use in *Citrus* sp. agroecosystems, such high salinity and boron concentration.

In the other hand, soil is the fundamental substrate of agriculture. Within soil, microorganisms are greatly responsible of the dynamics of organic matter which remain fundamental to crop yield and soil sustainability [1]. Moreover soil microbial properties can act as early-warning indicators of changes in ecosystems [2].

In this sense, the potential negative effects of wastewaters in plants can be early detected by soil microbial parameters.

Traditionally, the activity of microorganisms has been evaluated by microbial-ecosystem indicators such as soil respirations and enzyme activities involved in the cycles of C, N and P [3, 4].

For a water management perspective, this study aims to answer the following question: is it better the irrigation with wastewater alone or in combination with fresh water? In this respect, combinations of water from different sources might represents a proper

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Experimental area, irrigation treatments and soil sampling

The experiment was carried out in Campotéjar-Murcia, Spain with a Mediterranean semiarid climate. The annual reference evapotranspiration (ET_0) and rainfall are, on average, 1326 and 300 mm, respectively. Within this area an orchard of 1 Ha was cultivated with 2 crops. One crops consisted of a 16 year old mandarin trees (*Citrus clementina* cv. *Orogrande*) grafted on Carrizo citrange (*Citrus sinensis* [L.] osb x *PoncirusTrifoliata* [L.]) rootstock. The other crop consisted of 11 year old “*Star Ruby*” grapefruit trees grafted on *Macrophylla* rootstock (*Citrus macrophylla*). Four irrigation treatments were established:

- i) freshwater from the Tajo-Segura water transfer canal and well (TW)
- ii) reclaimed water from a wastewater treatment plant (RW)
- iii) irrigation with TW, except in the second stage of fruit development when (RWC) was applied
- iv) Irrigation with RW, except in the second stage of fruit development when (TWC) was applied.

The trees were irrigated at 100% ET_c from January to December. The replicated plots (n=3) for each treatments and crop were established. A composite soil sample under the canopy of one tree for each sample was composed of six subsamples.

2.2 Water characterization and sampling

The soil within the first 90 cm depth had a loamy texture (24% clay, 33% loam, and 43% sand), with an average bulk density of 1.37 g cm⁻³. Before the experiment, the soil electrical conductivity (EC) was 2.1 dS m⁻¹. Samples were taken to a depth of 20 cm in October 2015, before harvesting the fruit. The EC_w was 1 ds/m for TW and 3 21 dSm⁻¹ for RW. SAR (meq/l) was 1,39 (TW) and 9,45 (RW)

2.3 Plant water status and gas exchange parameters.

The stem water potential was analyzed monthly at midday using a pressure chamber (model3000; Soil Moisture Equipment Corp., Santa Barbara, USA). Two mature leaves from the canopy were selected. At least 2 h before the measurement, the leaves were covered with aluminum foil and enclosed within polyethylene bags.

2.4. Data analysis

The normality and homogeneity of the variables were checked by the Kolmogorov-Smirnov and Levene tests, respectively. The variables were transformed logarithmically when necessary. Data were analyzed using two-way ANOVA with irrigation treatment and crop as main factors. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSION.

Significant differences between TW and RW water were observed: RW had greater salinity and sodicity, with average values of EC_w around 3.21 dS m⁻¹ and SAR_w around 9.45 meq/l, whereas TW had lower values of EC_w , 1.00 dSm⁻¹ and SAR_w 1.39 meq/l. The RW water also had higher concentrations of NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , Cl^- , K, B, and Na than TW. The concentrations of organic C and N in the reclaimed water were 18 and 7 mg/l, respectively.

Overall, the bacterial and fungal soil PLFA contents were higher under grapefruit than under mandarin trees. In the case of grapefruit, TW produced a lower bacterial PLFA content than RW, RWc, or TWc. In contrast, RW showed the lowest values in the mandarin trees (Fig. 1).

The treatment and crop, and their interaction, influenced significantly the net photosynthesis (A) and stomatal conductance (gs). The stem water potential (Ψ_s) was affected significantly by crop. Lower annual average values of A and gs were observed in plants irrigated with RW, RWc or TWc, in comparison to TW (Table 2).

With the exception of RW, soil respiration was higher in grapefruit soil samples than in mandarin ones. Respiration was greatest in TWc soil in the case of grapefruit, and in RW in the case of mandarin (Table 3). The enzyme activities were higher in grapefruit soil than in mandarin soil, with the exception of β -glucosidase, cellobiohydrolase, and p-phenol oxidase for TWc.

4. CONCLUSION

Irrigation with reclaimed water did not negatively impact the soil microbial community of semiarid soils under grapefruit and mandarin crops. Indeed, the annual use of reclaimed water or the dual irrigation with TWc influenced positively the microbial biomass and biogeochemical activities of soil microbial communities under grapefruit. The mandarin community seemed more sensitive to the annual irrigation with RW but, overall, responded positively to dual irrigation. Changes in biomass and activity were coupled to variations in the structure of the microbial community. These microbial responses were probably shaped by the specific plant physiology, the rootstock sensitivity to salinity and water relations of the crop.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are grateful to MINECO projects and Seneca foundation.

6. REFERENCIAS

- [1] Nannipieri, P., Grego, S., Ceccanti, B., 1990. Ecological significance of the biological activity in soils. In: Soil Biochemistry (Eds.) Bollag, J.M., Stotzky, G. Marcel Dekker, New York, pp. 293-355.
- [2] Acosta-Martínez, V., Zobeck, T.M., Gill, T.E., Kennedy, A.C., 2003. Enzyme activities and microbial community structure in semiarid agricultural soils. *Biolog. Fertil. Soils*. 38, 216-227. DOI:10.1007/s00374-003-0626-1
- [3] Bastida, F., Torres, I.F., Romero-Trigueros, C., Baldrian, P., Vetrovsky, T., Bayona, J.M., Alarcón, J.J., Hernández, T., García, C., Nicolás, E. 2017a. Combined effects of reduced irrigation and water quality on the soil microbial community of a citrus orchard under semi-arid conditions. *Soil Biol. Biochem.* 104, 226-237. DOI: 10.1016/j.soilbio.2016.10.024
- [4] Rodríguez-Morgado, B., Gómez, I., Parrado, J., García-Martínez, A.M., Aragón, C., Tejada, M., 2015. Obtaining edaphic biostimulants/biofertilizers from different sewage sludges. Effects on soil biological properties. *Environ. Technol.* 36, 2217-2226. DOI: 10.1080/09593330.2015.1024760

Table 1. Soil chemical parameters, basal respiration, and microbial ratios in grapefruit and mandarin irrigation treatments.

Parameter	Grapefruit				Mandarin			
	TW	RW	TW _c	RW _c	TW	RW	TW _c	RW _c
TOC	0.99±0.11a*	0.92±0.01a	1.10±0.06b	0.91±0.07a*	0.75±0.04a	0.81±0.07a	1.24±0.07b	0.77±0.09a
Total N	0.19±0.01b*	0.14±0.01a	0.19±0.01b*	0.12±0.02a*	0.13±0.01a	0.14±0.01a	0.26±0.05b	0.16±0.01a
EC	616±187a	2486±221d	1786±98b	2070±143c	839±91a	2316±173d	1326±84b	1770±95c
pH	8.01±0.24a	8.43±0.27a	8.11±0.15a	8.09±0.19a	8.18±0.22a	8.30±0.17a	8.30±0.24a	8.41±0.20a
Respiration	25.21±1.39a*	29.98±2.14b	47.08±4.98c*	28.09±2.01b*	13.88±0.87a	31.40±2.54c	20.85±3.27b	13.86±0.55a
Resp/TOC	15.21±1.19a*	19.77±2.21a*	23.52±0.97b*	18.98±2.73a*	12.59±2.35b	25.53±2.47c	8.55±1.48a	11.73±1.14b
B/F	2.96±0.26a*	3.44±0.13b	3.43±0.17b	3.26±0.21b*	3.50±0.14a	3.76±0.16b	3.35±0.01a	3.70±0.20b
G+/G-	0.93±0.078ab*	0.86±0.11a	1.15±0.094b*	0.83±0.10a*	1.21±0.10b	0.77±0.12a	1.04±0.097b	1.13±0.083b

Table 2. The physiology, water status and yield of evaluated crops

Parameter	Grapefruit				Mandarin			
	TW	RW	TW _c	RW _c	TW	RW	TW _c	RW _c
A	12.91±0.33bc*	12.31±0.37c*	11.55±0.89b*	9.76±0.94a*	8.77±0.29b	6.81±0.32a	8.31±0.32b	6.95±0.56a
g_s	0.16±0.01c*	0.13±0.01bc*	0.12±0.01b*	0.10±0.01a*	0.086±0.01b	0.062±0.01a	0.070±0.01ab	0.065±0.01a
Ψ_s	1.083±0.84a*	1.13±0.94a*	1.11±0.97a*	1.13±0.94a*	0.80±0.37a	0.81±0.38a	0.81±0.47a	0.85±0.45a
Y	96.67±12.25a*	101.67±14.72a*	91.25±11.58a*	103.33±15.97a*	35.86 ± 3.47a	31.21 ± 2.14a	45.26 ± 3.51b	36.54 ± 2.87a

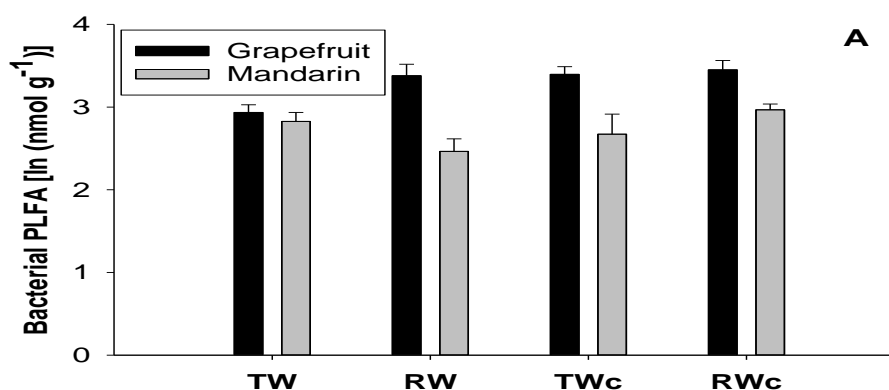


Figure 1. Bacterial and fungal soil PLFA contents.

Use of a new compost in the production of baby-leaf lettuce in floating systems

Uso de un nuevo compost en la producción de lechuga *baby leaf* en bandejas flotantes

A. Giménez^{1*}, J.A. Fernández¹, C. Egea-Gilabert², J.A. Pascual³

¹Dpto. Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena, Spain.

²Dpto. Ciencia y Tecnología Agraria. Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena, Spain.

³Dpto. Conservación de suelos y Agua y Manejo de Residuos Orgánicos. CEBAS-CSIC, Campus de Espinardo, E-30100-Murcia, Spain.

*almudena.gimenez@upct.es.

Abstract

The production of baby leaf lettuce in floating system is normally done using peat as a substrate, and can be affected by diseases as 'damping off', which are caused by *Pythium spp.* and other pathogens affecting growth and crop quality. The use of composts with suppressive effect can be used as an alternative to peat, helping to control these pathogens and allowing a more sustainable production system. The objective of this work was to study the use of a new compost (C14) obtained from residues of the agro-food industry in the pathosystem *Pythium irregulare*-lettuce on the lettuce quality and production. To that end, a cultivar of red lettuce 'Antoria' was sowing in floating trays using peat or C14 as substrate. Half of the trays were inoculated with *P. irregulare*. The crop was harvested 35 days after sowing. Under pathogen inoculation conditions, compost C14 kept lettuce plants growing. Also, C14 reduced nitrate content in lettuce leaves in both inoculation conditions. Therefore, the use of a new compost such as C14 with suppressive effect could be an alternative to peat in a floating tray system, improving the growth and quality of plants lettuce in the presence of the pathogen.

Keywords: *Lactuca sativa* L.; suppressiveness; damping off; hydroponic.

Resumen

La producción de lechuga (baby leaf) en bandejas flotantes se realiza normalmente empleando turba como sustrato, viéndose afectada por enfermedades como las marras de nacencia, causada por *Pythium spp.* y otros patógenos, que afectan al crecimiento y a la calidad del cultivo. El uso de compost con actividad supresiva podría permitir un sistema de producción más sostenible al reemplazar la turba para controlar este tipo de patógenos. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de un nuevo compost (C14), obtenido a partir de residuos de la industria agroalimentaria, en el patosistema *Pythium irregulare*-lechuga sobre la calidad y producción de lechuga. Para ello se sembró un cultivar de lechuga roja 'Antoria' en bandejas flotantes utilizando como sustrato turba o C14. La mitad de las bandejas fue inoculada con *P. irregulare*. El cultivo se recolectó a los 35 días tras la siembra. En condiciones de inoculación de patógeno C14 mantiene el crecimiento de las plantas de lechuga. Así mismo, C14 redujo el contenido de nitratos en hojas en ambas condiciones de inoculación. Por tanto, el uso de nuevos compost como el C14 con efecto supresivo podría ser una alternativa a la turba en sistema de bandejas flotantes, mejorando el crecimiento y calidad de las plantas en presencia de patógeno.

Palabras clave: *Lactuca sativa* L.; supresividad; marras de nacencia; hidropónico.

1. INTRODUCCIÓN

En la producción de lechuga (*Lactuca sativa* L.) de hoja pequeña (baby leaf) en sistema hidropónico de bandeja flotante se utiliza normalmente turba como sustrato. A veces las plantas puedan verse afectadas por enfermedades como las marras de nacencia, causada por patógenos como *Pythium spp.* La industria procesadora de frutas y hortalizas produce una gran cantidad de residuos orgánicos, que representan una importante fuente de nutrientes para las plantas y microorganismos y, por tanto, mejoran la producción de los cultivos [1]. Estos residuos, a través del compostaje, producirán un compost de alta calidad para ser utilizados en agricultura [2], como sustitutos totales o parciales de la turba. Además, el uso de determinados compost tiene un valor añadido por su carácter supresor de enfermedades [3]. Para las hortalizas (baby leaf), además de controlar patógenos, el compost también podría mejorar el rendimiento y la calidad del producto final, afectando por ejemplo al contenido final de nitratos, regulado por el Reglamento de la UE 1258/2011.

El objetivo de este trabajo consistió en evaluar el uso de un nuevo compost (C14), obtenido a partir de residuos de la industria agroalimentaria, en el patosistema *Pythium irregulare*-lechuga en la calidad y producción de lechuga, así como su capacidad de control biológico del patógeno.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento.

El ensayo se realizó en la estación experimental agrícola “Tomas Ferro” de la UPCT (37º 41 'N; 0º 57' O). Se utilizó el cultivar de lechuga roja ‘Antoria’ de la casa Rijk Zwaan. La siembra se realizó el 23 de noviembre de 2016 en bandejas "styrofloat" de 20 x 41 cm. Las bandejas se dispusieron en una cámara climática a 18°C, 90% de humedad relativa y oscuridad durante 48 horas. Seguidamente, se pasaron a unas mesas de cultivo de dimensiones 1,35 x 1,25 x 0,2 m, ubicadas en el interior de un invernadero de policarbonato. Transcurrida una semana se realizó un aclareo de plántulas, dejando 8 por fisura (1600 plantas/m²). Al mismo tiempo, se aplicó la solución nutritiva al agua [4]. La duración del ciclo de cultivo fue de 35 días.

2.2 Sustratos orgánicos empleados

El compost agroindustrial utilizado fue el C14, compuesto por tomate (71%), cebolla (17%) y residuos de viñedo (12%). El compost fue producido por el CEBAS-CSIC en pilas al aire libre, con una fase biooxidante y una de maduración de 75 y 42 días, respectivamente. El control fue un sustrato comercial (Pindstrup), compuesto principalmente por turba rubia.

2.3 Patógeno e inoculación

La solución de micelio de *P. irregulare* se obtuvo a partir de un inóculo infectivo crecido en placa Petri con patata dextrosa agar a 28°C durante 7 días. La mitad de las bandejas se llenaron con sustrato (C14 y turba) inoculado (I) con el patógeno *P. irregulare* a la dosis de 1 10⁵ ufc/g de sustrato. Los controles fueron bandejas rellenas con turba o C14 no inoculado (NI).

2.4 Análisis en el momento de la recolección

En el momento de la recolección se analizaron los siguientes parámetros en 32 plantas. El área foliar se determinó con el medidor de área foliar (LICOR- 3100 C). La longitud total y el diámetro de raíz se determinaron con el contador de raíces Winzhizo LA 1600. El contenido de nitratos se cuantificó por cromatografía iónica [5]. El contenido de fenoles totales se determinó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. La capacidad antioxidante se evaluó según Brand-Williams y col. [6] con las modificaciones descritas por Pérez-Tortosa [7]. El contenido en vitamina C, determinado como la suma del ácido ascórbico (AA) y del ácido dehidroascórbico

(DHA), se midió usando cromatografía líquida de alta resolución (Shimadzu Corporation, Canby, OR) [8].

2.5 Análisis estadístico

Para el diseño experimental se consideró como parcela elemental una bandeja "styrofloat" de 20 cm x 41 cm, disponiendo de 4 repeticiones al azar por tratamiento (NI/Turba, NI/C14, I/Turba, I/C14). Los datos tomados se sometieron a un análisis de variancia multifactorial ANOVA, utilizando el test LSD (95%) para la separación de las medias mediante el software Statgraphics Plus para Windows, versión 2.1.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el crecimiento vegetativo hubo interacción significativa entre la inoculación y el tipo de sustrato en el área foliar y la altura de la planta (Tabla 1). De los resultados de la interacción se destaca que los valores de altura se redujeron significativamente en turba inoculada. El valor de área foliar aumentó significativamente en las plantas cultivadas con C14 inoculado. El crecimiento radical no se vio afectado ni por la inoculación ni por los sustratos empleados (Tabla 1). El contenido de nitratos en hojas presentó una interacción significativa entre la inoculación y el tipo de sustrato (Tabla 2). De los resultados obtenidos se observó que el contenido de nitratos fue significativamente mayor en turba no inoculada respecto al resto de tratamientos, siendo en plantas cultivadas con C14 inoculado el más bajo debido, probablemente, a que parte del nitrógeno es requerido por la planta para la biosíntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis y otros componentes de la defensa vegetal [9]. Los valores obtenidos se encuentran muy por debajo de los niveles máximos establecidos por la Comisión Europea en el Reglamento de la UE 1258/2011, que para lechuga en invernadero en dichas fechas es de 5000 mg/kg. El contenido de felones totales, capacidad antioxidante y vitamina C en hojas presentan interacción significativa entre la inoculación y el tipo de sustrato (Tabla 2).

4. CONCLUSIONES

En condiciones de inoculación del patógeno, el uso de un nuevo sustrato como el compost agroindustrial C14 mejora el crecimiento aéreo de las plantas de lechuga (baby leaf) cultivadas en bandeja flotante, mostrando la capacidad de reducir la infección del patógeno en la planta. El contenido de nitratos en hojas se ve reducido considerablemente en presencia de patógeno, mejorando la calidad de las plantas. Los resultados obtenidos sugieren que el uso de compost con efecto supresivo podría ser una alternativa a la turba en sistema de bandejas flotantes, ya que mejora el crecimiento y calidad de las plantas en presencia de patógeno.

5. AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto de tesis doctoral ha sido parcialmente financiado por los proyectos AGL-2014-52732-C2-1-R y AGL-2014-52732-C2-2-R. del Ministerio de Economía y Competitividad de España.

6. REFERENCIAS

[1] Hernández T., Chocano C., Moreno J.L., García C. 2014. Towards a more sustainable fertilization: combined use of compost and inorganic fertilization for tomato cultivation. *Agr. Ecosyst. Environ.* 196: 178-184.

- [2] Blaya J., Lloret E., Ros M., Pascual J.A. 2015. Identification of predictor parameters to determine agro-industrial compost suppressiveness against *Fusarium oxysporum* and *Phytophthora capsici* diseases in muskmelon and pepper seedlings. *J. Sci. Food Agric.* 95: 1482-1490.
- [3] Hadar Y., Papadopoulou, K.K. 2012. Suppressive composts: Microbial Ecology Links Between Abiotic Environments and Healthy Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 50: 133-153.
- [4] Egea-Gilabert C., Fernández J.A., Migliaro D., Martínez-Sánchez J.J., Vicente M.J. 2009. Genetic variability in wild vs. cultivated *Eruca vesicaria* populations as assessed by morphological, agronomical and molecular analyses. *Sci. Hort.* 121: 260-266.
- [5] Lara L.J., Egea-Gilabert C., Niñirola D., Conesa E., Fernández J.A. 2011. Effect of aeration of the nutrient solution on the growth and quality of purslane (*Portulaca oleracea*). *J. Hort. Sci. Biotech.* 86: 603-610.
- [6] Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol.* 28: 25-30.
- [7] Pérez-Tortosa V, López-Orenes A, Martínez-Pérez A, Ferrer M.A., Calderón AA. 2012. Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. *J. Agr. Food Chem.* 130: 362-369.
- [8] Rodríguez-Hidalgo S., Artés-Hernández F., Gómez P., Fernández J.A., Artés F. 2010. Quality of fresh-cut baby spinach grown under a floating trays system as affected by nitrogen fertilization and innovative packaging treatments. *J. Sci. Food Agr.* 90: 1089-1097.
- [9] Schultz J.C., Appel H.M., Ferrieri A.P., Arnold, T.M. 2013. Flexible resource allocation during plant defence responses. *Front. Plant Sci.* 4: 324.

Tabla 1. Influencia de la inoculación con *P. irregulare* (no inoculado -NI- e inoculado -I-) y tipo de sustrato (turba y compost C14) en los parámetros de crecimiento aéreo y radicular en lechuga roja (baby leaf) cv ‘Antoria’ cultivada en bandeja flotante.

Inoculación (A)	Sustrato (B)	Rendimiento (gr/planta)	Área Foliar (cm ²)	Altura (cm)	Long. total raíz (cm)	Diám. raíz (mm)	Long. 0-0,5 diám. raíz (mm)
NI		1,27	35,45	11,86 b ^z	142,88	0,32	130,67
I		1,22	36,11	10,77 a	161,98	0,33	148,58
	Turba	1,27	36,53	11,43	158,38	0,33	143,91
	C14	1,22	35,02	11,19	146,48	0,32	135,35
	A	n.s.	n.s.	***y	n.s.	n.s.	n.s.
	B	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	AxB	n.s.	*	***	n.s.	n.s.	n.s.

^z Los valores dentro de la misma columna seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes $P \leq 0.05$.

^y Los asteriscos indican significancia * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; n.s: no significativo.

Tabla 2. Influencia de la inoculación con *P. irregulare* (no inoculado -NI- e inoculado -I-) y tipo de sustrato (turba y compost C14) en los parámetros bioquímicos en lechuga roja (baby leaf) cv ‘Antoria’ cultivada en bandeja flotante.

^z Los valores dentro de la misma columna seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes $P \leq 0.05$.

Inoculación (A)	Sustrato (B)	Fenoles totales (mg GA/kg FW)	Cap. Antiox. (mg DPPH reduced/kg FW)	Vitamina C (mg/kg FW)	Nitrato (mg/kg FW)
NI		1111,44 a ^z	169,74	151,04	908,16 b
I		1585,76 b	169,53	159,94	685,58 a
	Turba	1582,24 b	157,92 a	171,57 b	941,19 b
	C14	1117,96 a	181,35 b	139,40 a	652,55 a
	A	*y	n.s.	n.s.	***
	B	*	**	**	***
	AxB	***	**	***	***

^y Los asteriscos indican significancia * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; n.s: no significativo.

GA: ácido gálico; DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo; FW: peso fresco.

Effect of regulated deficit irrigation on vegetative growth and yield of sweet cherry

Efecto del riego deficitario controlado sobre el crecimiento vegetativo y el rendimiento en cerezo

V. Blanco*, P.J. Blaya-Ros, A. Pérez-Pastor, R. Domingo

¹Dpto. de Producción Vegetal. ETSIA-UPCT, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena. Spain.

*victor.blanco@upct.es

Abstract

A two-year experiment in sweet cherry (*P. avium* L. cv “Prime Giant”) trees under regulated deficit irrigation (RDI) was carried out to evaluate the effect of RDI on vegetative growth and yield. The moderate water stress during postharvest achieved significantly lower pruning wood and not involving a lower yield. RDC resulted in water saving of 35% compared to the control treatment.

Keywords: Midday stem water potential; Prime Giant; pruning; *Prunus avium* (L.).

Resumen

Se realizó un ensayo de riego deficitario controlado (RDC) de dos años de duración en cerezo (*P. avium* L. cv “Prime Giant”) con el objetivo de evaluar el efecto de RDC sobre el rendimiento y crecimiento vegetativo del árbol. El déficit hídrico moderado aplicado en RDC en poscosecha no afectó al rendimiento pero sí al vigor de los árboles resultado en un menor peso de poda. RDC supuso un ahorro de agua del 35% con respecto al tratamiento control.

Palabras clave: Poda; potencial hídrico de tallo a mediodía; Prime Giant; *Prunus avium* (L.).

1. INTRODUCCIÓN

La agricultura de regadío es el principal consumidor de agua a nivel mundial. Por eso, la agricultura de regiones en situación estructural de permanente escasez hídrica debe mejorar el manejo y la eficiencia del agua. Estrategias de riego como el riego deficitario controlado (RDC) han demostrado en diferentes cultivos que es posible reducir los volúmenes de riego aportados a un cultivo con mínima o nula penalización en la producción y calidad de las cosechas, disminuyendo generalmente el crecimiento vegetativo [1]. En cerezo, debido a su corto ciclo reproductivo, la mayor parte de la evapotranspiración anual se centra en el periodo poscosecha, periodo en el que continúa el crecimiento vegetativo. Esta diferencia de duración de ambos ciclos puede provocar excesivo crecimiento vegetativo. Cerezos con demasiado vigor son poco precoces, poco productivos y de difícil manejo [2]. El RDC ha demostrado ser eficaz para evitar vigor excesivo.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la idoneidad del cerezo para ser manejado en RDC y evaluar la influencia de la estrategia de riego sobre la producción y el crecimiento vegetativo del cerezo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se llevó a cabo durante dos años consecutivos, 2015 y 2016, en una parcela experimental de 0,5 ha perteneciente a la finca comercial “Finca Toli”, localizada en Jumilla, Murcia (38° 8' N; 1° 22' W y 680 m de altitud). La plantación de cerezos (*Prunus avium* (L)) de 15 años de edad, variedad ‘Prime Giant’ sobre SL 64, está dispuesta a marco de 5 x 3 m y cuenta con polinizadores cv. Brooks y Early Lory. El sistema de riego por goteo constó de un único lateral por hilera de árboles y 3 goteros por árbol de 4 L h⁻¹. El agua de riego es de pozo y de buena calidad (CE 0,8 dS m⁻¹). El suelo es de textura franco-arenosa y medianamente pedregoso. Se aplicaron dos tratamientos de riego: i) control (CTRL), regado al 110% de la evapotranspiración potencial del cultivo (ET_{cg}) con el objetivo de mantener condiciones no limitantes de agua en el suelo, y ii) riego deficitario controlado (RDC), programado al 90% de ET_{cg} durante precosecha, 100% de ET_{cg} durante poscosecha inicial (inducción-diferenciación floral, Junio), y al 65% de ET_{cg} en la poscosecha restante (Julio - Noviembre). ET_{cg} se determinó de acuerdo con la expresión propuesta por FAO:

$$ET_{cg} = ET_0 \times K_c \times K_r$$

donde ET₀ es la evapotranspiración de referencia, K_c el coeficiente de cultivo [3] y K_r un coeficiente corrector por localización [4].

El diseño experimental fue de bloques al azar con 4 repeticiones por tratamiento y 7 árboles por repetición. El potencial hídrico de tallo a mediodía (Ψ_t) se midió semanalmente en seis árboles por tratamiento, en hojas cercanas a la base del tronco y envueltas con plástico y papel de aluminio durante dos horas, utilizando una cámara de presión (Soil Moisture Equipment Corp., Model 3005, Santa Barbara, CA, USA). En el momento de la cosecha (día del año, DDA, 154 y 161 para 2015 y 169 y 174 para 2016) se pesó la producción individual de los cinco árboles centrales de cada repetición y se contaron y pesaron 200 frutos de cada árbol para obtener el rendimiento (t ha⁻¹) y peso medio unitario del fruto. Se seleccionaron 25 frutos representativos por repetición de entre los 200 contados a los cuales se les midió su diámetro ecuatorial, D. Ecuat (mm), con un calibre digital de precisión $\pm 0,01$ mm (Storm, Barcelona, Spain).

El crecimiento vegetativo se evaluó anualmente midiendo los diámetros y altura de copa de los tres árboles centrales de cada repetición y tratamiento con la finalidad de determinar el volumen de la copa [5]. Para llevar a cabo la medición se utilizaron jalones encastrables de 2 m de longitud. La altura de copa se determinó como la diferencia entre la máxima altura del árbol y la de la cruz. El peso de la madera de poda se empleó también como un índice de medida del vigor del árbol, expresando sus valores en peso seco. Para ello se aplicó la expresión de transformación de peso fresco (pf) a seco (ps) obtenida en la poda de 2015 ($ps = 0,5618 pf + 0,0393$). Tanto los pesos de poda como la producción, se obtuvieron con una balanza electrónica (Scaltec, modelo SSH91, Heiligenstadt, Germany).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las condiciones meteorológicas fueron similares en ambos años de estudio y típicas del clima mediterráneo con veranos secos y calurosos e inviernos suaves y húmedos. La ET₀ y lluvia acumuladas durante el periodo de estudio (marzo – noviembre) fueron de 990 y 1050 y de 191 y 201 mm en 2015 y 2016, respectivamente. Los volúmenes de riego aplicados fueron: 6916 y 4463 m³ ha⁻¹ (2015) y 7030 y 4639 m³ ha⁻¹ (2016) para CTRL y RDC, respectivamente. RDC supuso un ahorro de agua del 35% y 34% con respecto a CTRL en 2015 y 2016.

Ψ_t fue el indicador utilizado para conocer el estado hídrico de la planta y poder evaluar el estrés hídrico aplicado. En precosecha ambos tratamientos mostraron valores medios similares indicando ausencia de estrés hídrico en el cultivo, siendo los valores medios de -0,53 y -0,57 MPa en RDC y -0,50 y -0,53 MPa en CTRL para 2015 y 2016, respectivamente. Durante el primer

periodo poscosecha (154-168 DDA en 2015 y 170-184 DDA en 2016), en el cual tiene lugar la inducción floral, los valores de Ψ_t fueron estadísticamente similares en ambos tratamientos, independientemente de que los niveles medios Ψ_t presentasen valores de -0,52 y -0,74 MPa para 2015 y 2016, respectivamente. Esta tendencia a presentar valores inferiores en 2016 pudo deberse al hecho de que la primera cosecha tuvo lugar 15 días antes en 2015 y por tanto las condiciones ambientales fueron más demandantes en el primer periodo poscosecha de 2016. A pesar de los 0,22 MPa de diferencia entre CTRL y RDC ambos pertenecerían a la calificación de ausencia de estrés hídrico [6]. En la segunda parte del periodo poscosecha, fase en la que se aplica el déficit hídrico controlado a RDC, los valores de Ψ_t descendieron en ambos tratamientos como consecuencia del aumento de la demanda evaporativa, si bien en RDC se vieron incrementados por el déficit hídrico aplicado. En este segundo periodo poscosecha Ψ_t experimentó una brusca caída en RDC, llegando a alcanzar valores medios de -0,87 y -0,95 MPa para 2015 y 2016, mientras que en CTRL estuvieron en -0.69 MPa en ambos años de estudio.

El estrés hídrico aplicado en RDC no fue excesivo si tenemos en cuenta los valores Ψ_t alcanzados. Éstos fueron inferiores al valor umbral indicado por Marsal et al. (2010) [6], -1,5 MPa, a partir del cual podría verse negativamente afectada la cosecha de la próxima campaña. No hubo diferencias significativas en rendimiento entre tratamientos en ninguno de los dos años de estudio (Tabla 1). Sin embargo, los valores medios de rendimiento fueron diferentes en 2015 con respecto a 2016. Así, este último, fue un año altamente productivo, con un rendimiento 1,75 veces superior a 2015, aunque esta diferencia se vio acentuada por las pérdidas de cereza ocasionadas por granizo, las que oscilaron entre 1,5 – 2,0 t ha⁻¹. Con respecto al tamaño del fruto, uno de los parámetros decisivos para la aceptación de la cereza por parte del consumidor [7] y por lo tanto para la rentabilidad económica de la explotación, no hubo diferencias significativas ni en peso unitario ni en diámetro ecuatorial.

CTRL y RDC presentaron similares crecimientos vegetativos en ambos años de estudio, es decir, sin diferencias significativas en el volumen de copa ni en la superficie sombreada (Figura 1). Sin embargo, la relación de los valores promedios anuales del volumen de copa (2016/2015) aumentaron en CTRL, mientras que permanecieron relativamente constantes en RDC. En relación al peso de poda, el tratamiento CTRL mostró en 2016 un peso de poda significativamente mayor que el tratamiento RDC, observándose una relación directa de la cantidad de agua aportada con los restos de poda. En 2015, aunque los restos de poda de RDC fueron inferiores que en CTRL no hubo diferencias significativas entre tratamientos, diferencias que si se observaron en 2016, apreciándose un efecto acumulativo del déficit hídrico sobre el crecimiento vegetativo [8].

4. CONCLUSIONES

Un ahorro de agua del 35% respecto al tratamiento control no redujo la producción ni penalizó el tamaño del fruto, reduciendo significativamente el crecimiento vegetativo de los árboles RDC durante el segundo año de estudio. Estos resultados deberán ser corroborados en las siguientes campañas antes de recomendar la estrategia de riego deficitario controlado como la más idónea para la conservación del agua y mejora de la productividad en zonas semiáridas con escasos recursos hídricos y aguas de buena calidad.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad del Gobierno de España (MINECO) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (Ref. AGL2016-77282-C3-3-R). Víctor Blanco agradece a la Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT) la beca de iniciación a la actividad investigadora que le fue concedida. Los autores agradecen a Pedro y Agustín Carrión-Guardiola de “Finca Toli” todas las facilidades dadas para llevar a cabo los ensayos realizados.

6. REFERENCIAS

- [1] Ruiz-Sanchez, M.C.; Domingo, R., Castel, J.R., 2010. Revisión. Riego deficitario en frutales y vid en España (Review. Deficit irrigation in fruit trees and vines in Spain). Span. J. Agric. Res. 8, 5-20.
- [2] Podestá, L., Vallone, R., Sánchez, E., Morábito, J.A., 2010. Effect of water deficit irrigation on vegetative growth of young cherry trees (*Prunus avium* L.). Rev. FCA UNCuyo, 42(1):73-91.
- [3] Marsal, J. FAO Irrigation and drainage paper 66. 2012. Crop yield response to water. Sweet cherry, 449-457 2012. FAO, Rome.
- [4] Fereres, E., Martinich, D.A., Aldrich, T.M., Castel, J.R., Holzappel, E., Schulbach, H., 1982. Drip irrigation saves money in young almond orchards. Calif. Agric. 36, 12-13.
- [5] Hutchinson, D.J., 1978. Influence of rootstock on the performance of “Valencia” sweet orange. Proceedings International Society of Citriculture, 2: 523-525.
- [6] Marsal, J., López, G., del Campo, J., Mata, M., Arbones, A., Girona J., 2010. Postharvest regulated deficit irrigation in Summit sweet cherry: fruit yield and quality in the following season. Irrigation Sci. 28, 181-189.
- [7] Crisosto, C.H., Crisosto, G.M., Metheney, P. (2003). Consumer acceptance of ‘Brooks’ and ‘Bing’ cherries is mainly dependent on fruit SSC and visual skin color. Postharvest Biol. Technol. 28:159-167.
- [8] Johnson, R.S. y Handley, D.F. (1999). Using water stress to control vegetative growth and productivity of temperate fruit trees. HortScience. 35(6):1048-1050.

Tabla 1. Rendimientos ($t\ ha^{-1}$), peso unitario (g) y diámetro ecuatorial (mm) para CTRL y RDC.

	Rendim ($t\ ha^{-1}$)		P.Unit (g)		D.Ecuat (mm)	
	2015	2016	2015	2016	2015	2016
CTRL	15,58	28,85	11,78	9,02	30,33	27,35
RDC	16,96	28,14	11,06	8,87	29,86	27,28
ANOVA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

n.s. indica ausencia de diferencias significativas entre tratamientos según el ANOVA ($P < 0.05$).

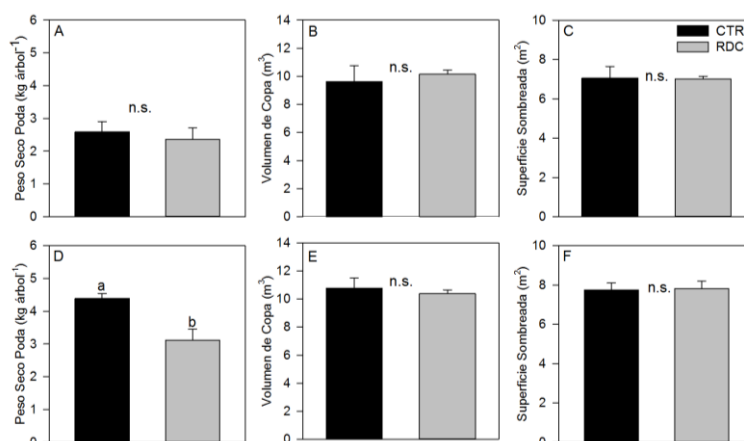


Figura 1. Poda expresada en peso seco ($kg\ árbol^{-1}$), volumen de copa (m^3) y superficie sombreada (m^2) para CTRL y RDC. A, B y C son datos de 2015 y D, E y F de 2016. Diferentes letras en la misma gráfica indican diferencias significativas entre tratamientos según el ANOVA ($P < 0.05$), n.s. indica ausencia de diferencias.

Resistance of *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) to lambda-cyhalothrin

Resistencia de *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) a lambdacihalotrín

V.Balanza^{1*}, J.E. Mendoza¹, P. Bielza¹

¹ Departamento de Producción Vegetal, ETSIA. Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203. Cartagena, España.

*virgibalanza@hotmail.com

Abstract

Orius laevigatus is a natural enemy used as biological control agent. One of the problems in integrated pest management (IPM) is the compatibility between natural enemies and some phytosanitary treatments with the purpose of both can be used at the same time in the crops. Starting from this point, a population of *O. laevigatus* resistant to lambda-cyhalothrin from wild populations was created, so that both can be used simultaneously in the IPM programs. Lambda-cyhalothrin was found to be slightly harmful to all wild populations of *O.laevigatus* (class 2). In the resistant population, there were significant differences between the initial generation (G0) and the generation 18 (G18) (22.6 times), the toxicity class varied from 2 to 1 (harmless) and the resistance was maintained over time.

Keywords: IPM, toxicity, phytosanitary.

Resumen

Orius laevigatus es un enemigo natural usado como agente de control biológico. Uno de los principales problemas de la gestión integrada de plagas (GIP) es la compatibilidad entre los enemigos naturales y los fitosanitarios para que ambos puedan ser utilizados a la vez en los cultivos. Partiendo de este punto, se creó una población de *O. laevigatus* resistente a lambdacihalotrín a partir de poblaciones silvestres, para que ambos puedan utilizarse simultáneamente en los programas de GIP. Lambdacihalotrín resultó ser levemente dañino para todas las poblaciones silvestres de *O. laevigatus* (clase 2). En la población resistente, existieron diferencias significativas entre la generación inicial (G0) y la generación 18 (G18) (22,6 veces), la clase de toxicidad varió de 2 a 1 (inofensivo) y la resistencia se mantuvo en el tiempo.

Palabras clave: GIP, toxicidad, fitosanitario.

1. INTRODUCCIÓN

Orius laevigatus (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) es un depredador polífago, pero es usado principalmente como enemigo natural para el control del trips *Frankliniella occidentalis* (Pergande) [1].

Debido a la dificultad de no poder controlar a algunas plagas solamente con insecticidas, se desarrolló un programa de gestión integrada de plagas (GIP) en el que se usan conjuntamente productos químicos y agentes de control biológico (ACB) [2]. Este sistema se ha impuesto ya

definitivamente en la mayoría de cultivos hortícolas, especialmente en los producidos bajo invernadero [3]. La clave está en conseguir que los insecticidas utilizados no interfieran con los agentes de control biológico, lo que requiere un conocimiento acerca de la utilización de ambos [2].

Los insecticidas piretroides, como el lambdacihalotrín, son comúnmente utilizados contra diferentes especies de plagas de lepidópteros y coleópteros [4]. Debido a su toxicidad, lambdacihalotrín causa en los enemigos naturales una reducción de la población, cambios de comportamiento y distintos efectos subletales [5].

En el presente estudio, se creó una población de *O. laevigatus* resistente a lambdacihalotrín a partir de poblaciones silvestres, con el objetivo de ambos puedan utilizarse simultáneamente en los programas de GIP. Posteriormente se comprobó si la resistencia obtenida era sostenible en el tiempo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Recolección y cría de *O. laevigatus*:

Se recolectaron un total de 8 poblaciones silvestres de *O. laevigatus* procedentes de distintas partes de España: Mérida (Toledo), Catadoiro (Pontevedra), Cazorla (Jaén), Logroño (La Rioja), Teruel (Teruel), Cabrils (Barcelona), Carmona (Sevilla) y Ruidera (Ciudad Real). También se ensayó una población comercial: Biobest® (Bélgica). Posteriormente se realizó la cría y mantenimiento en el laboratorio.

2.2 Bioensayos y selecciones:

Se realizaron bioensayos previos con individuos adultos para cada una de las poblaciones, con el fin de determinar la tolerancia inicial a lambdacihalotrín. Las dosis de insecticida fueron: 10-300 mg L⁻¹. Los ensayos se realizaron de manera residual, con judías sumergidas en insecticida, con distintas dosis, un control y varias repeticiones por dosis. A los 3 días se estimó la mortalidad.

De cada bioensayo hecho para cada una de las poblaciones, se seleccionaron a los individuos más resistentes, los cuales se mezclaron en un bote y se empezaron a criar. A partir de esta población inicial (G0), se realizaron selecciones sucesivas, aplicando cada vez dosis de lambdacihalotrín más altas (100-3000 mg L⁻¹) y seleccionando a los individuos más resistentes en cada paso de selección. Las selecciones se realizaron de manera residual, utilizando judías previamente sumergidas en insecticida y la mortalidad se estimó a los 3 días. Cuando se obtuvo una población resistente (G18), se comprobó mediante bioensayos en generaciones posteriores (G21, G24 y G28) si la persistencia era sostenible en el tiempo.

2.3 Tratamiento de los datos:

Los datos obtenidos se analizaron con el programa POLO PLUS® usando un análisis Probit. Se calcularon las concentraciones letales (CL₅₀) y los límites fiduciales (LF) al 95% de confianza. Se calculó también la línea base de susceptibilidad, el factor de susceptibilidad natural (FS) y la mortalidad a la dosis de campo de las poblaciones silvestres y de la población seleccionada. Para la evaluación de la mortalidad, se utilizaron las clases de toxicidad desarrolladas para la prueba de laboratorio de toxicidad por contacto inicial del "peor caso" [6]: clase 1 (inofensivo): efecto <30%; clase 2 (levemente dañino): 30-79% de efecto; clase 3 (moderadamente nocivo): 80-99% de efecto; clase 4 (nocivo): efecto > 99%.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se observaron diferencias significativas entre poblaciones en los bioensayos de tolerancia a lambdacihalotrín (Tabla 1), aunque Catadoiro obtuvo un valor de 5,1 mg L⁻¹ para la CL₅₀, siendo la más sensible del grupo, y la población comercial obtuvo un valor de 19,4 mg L⁻¹, con un Factor de susceptibilidad (FS) de 3,8, colocándose así como la más tolerante. La clase de toxicidad para todas las poblaciones fue de 2 (levemente dañino), con unos valores de mortalidad a la dosis de campo (MDC) comprendidos entre 50,5-78,3%. Para la línea base de susceptibilidad se obtuvo un valor de 9,1.

Se consideró el valor obtenido para la línea base de susceptibilidad como el valor de toxicidad de la población inicial (G0) (Tablas 1 y 2), a partir de la cual se empezaron las selecciones. En la tabla 2, donde se muestran las distintas generaciones de la población seleccionada, se observó un valor para CL₅₀ de 124,2 mg L⁻¹ en la generación 13 (G13), existiendo diferencias significativas entre la G0 y ésta, siendo además, 13,5 veces más tolerante a lambdacihalotrín que la G0. La clase de toxicidad varió de 2 en la G0 a 1 (inofensivo) en la G13, bajando también la MDC de 61,8% a 14,3% para la G0 y la G13, respectivamente. Se realizó otro bioensayo de toxicidad en la G18 y se observó que la resistencia se mantenía (FS=22,6), por lo que se consideró una población resistente. Posteriormente, se realizaron bioensayos en las G21, G24 y G28 y no se observaron diferencias significativas entre estas generaciones y las anteriores, la clase de toxicidad fue de 1 y la MDC fue baja en todas (7,9-26,4%). Debido a estos últimos resultados, se pudo comprobar que la resistencia se mantuvo en el tiempo, por lo que la población se consideró persistente a lambdacihalotrín.

No se ha encontrado ningún estudio de toxicidad ni resistencia a lambdacihalotrín para *O. laevigatus*. No obstante, sí se han hecho estudios en otros enemigos naturales. Costa et al [7], comprobaron la susceptibilidad de 20 poblaciones de la mariquita *Eriopis connexa*, encontrando que 10 poblaciones tuvieron tasas de supervivencia mayores del 50% y D'Ávila et al [8], han comprobado que lambdacihalotrín debido a su toxicidad, produce efectos subletales y resistencia en esta misma especie. Otro estudio [9], evaluó la resistencia de 7 especies de mariquitas, concluyendo que es común que las mariquitas ofrezcan resistencia a lambdacihalotrín. Nuestros resultados son comparables con los estudios anteriores, ya que lambdacihalotrín fue levemente dañino para las poblaciones de *O. laevigatus* y se consiguió resistencia en este enemigo natural.

4. CONCLUSIONES

Se obtuvo una población resistente a lambdacihalotrín de hasta 22,6 veces en la G18, a partir de una mezcla de poblaciones silvestres, con una reducción de la clase de toxicidad y de la MDC. También se comprobó que esta población mantiene su resistencia en el tiempo.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos a mis compañeros de laboratorio.

6. REFERENCIAS

- [1] Chambers, R.J., Long, S., Helyer, N.L. 1993. Effectiveness of *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae) for the control of *Frankliniella occidentalis* on cucumber and pepper in the UK. *Biocontrol Sci. Techn.* 3:295-307.
- [2] Delbeke F., Vercruyse P., Tirry L., De Clercq P., Degheele D. 1997. Toxicity of diflubenzuron, pyriproxyfen, imidacloprid and diafenthiuron to the predatory bug *Orius laevigatus* (Heteroptera: Anthocoridae). *Entomophaga*. 42(3):349-358.

[3] Calvo F.J., Blockmans K., Belda J.E. 2012. Biological control based IPM in sweet pepper greenhouses using *Amblyseius Swirskii* (Acari: Phytoseiidae). *Biocontrol Sci. Techn.* 22:1398-1416.

[4] Ruberson J.R., Tillman P.G. 1999. Effect of selected insecticides on natural enemies in cotton: a laboratory study. Paper presented at: National Cotton Council Beltwide (Tifton, GA). Pp. 1210-1213.

[5] Ferreira E.S., Rodrigues A.R.S., Silva-Torres C.S.A., Torres J.B. 2013. Life-history costs associated with resistance to lambda-cyhalothrin in the predatory ladybird beetle *Eriopis connexa*. *Agric. Forest Entomol.* 15:168-177.

[6] Sterk G, Hassan S.A, Baillod R. 1999. Results of seventh joint pesticides testing programme carried out by the IOCB/WPRS Working Group "Pesticides and Beneficial Organisms". *Biocontrol.* 4; 99-117.

[7] Costa P.M.G., Torres J.B., Rondelli V.M., Lira R. 2017. Field-evolved resistance to lambda-cyhalothrin in the lady beetle *Eriopis connexa*. *Bull. Entomol. Res.* 1-8.

[8] D'Avila V.A., Barbosa W.F., Reis L.C., Gallardo B.S.A., Torres J.B., Guedes R. N. C. 2018. Lambda-cyhalothrin exposure, mating behavior and reproductive output of pyrethroid-susceptible and resistant lady beetles (*Eriopis connexa*). *Crop prot.*107: 41-47.

[9] Rodrigues A.R.S., Spindola A.F., Torres J.B., Siqueira H.A.A., Colares F. 2013. Response of different populations of seven lady beetle species to lambda-cyhalothrin with record of resistance. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 96: 53-60.

Tabla 1. Toxicidad de lambdacihalotrín para distintas poblaciones de *O. laevigatus*.

Población	CL ₅₀ (mg L ⁻¹) ^a	LF (95%) ^b	FS-CL ₅₀ ^c	Mortalidad DC (%) ^d	Clase ^e
Cabrils	11,9	(7,2-17,4)	2,3	64,7	2
Carmona	7,2	(1,7-18,6)	1,4	74,5	2
Ruidera	17,4	(5,0-28,9)	3,4	55,1	2
Teruel	14,5	(3,2-29,2)	2,8	57,4	2
Logroño	7,3	(1,0-13,5)	1,4	78,3	2
Méntrida	6,3	(2,3-11,1)	1,2	75,0	2
Cazorla	14,7	(7,9-25,5)	2,8	59,1	2
Catadoiro	5,1	(0,6-12,4)	1	66,3	2
Biobest	19,4	(9,6-34,1)	3,8	50,5	2
Línea Base=G0	9,1	(6,8-11,7)		61,8	2

^a) CL₅₀=concentración letal 50; ^b) LF =límites fiduciales (P<0,05); ^c) FS-CL₅₀= Factor de susceptibilidad calculado a partir de la CL₅₀; ^d) mortalidad a la dosis de campo (20 mg L⁻¹); ^e) clases de toxicidad.

Tabla 2. Evolución de la población de *O. laevigatus* seleccionada con lambdacihalotrín.

Generaciones	CL ₅₀ (mg L ⁻¹) ^a	LF (95%) ^b	FS-CL ₅₀ ^c	Mortalidad DC (%) ^d	Clase ^e
Línea base=G0	9,1	(6,8-11,7)	1	61,8	2
G13	124,2	(77,5-230,3)	13,5	14,3	1
G18	208,5	(106,5-396,1)	22,6	23,1	1
G21	71,5	(30,4-125,4)	7,7	25,3	1
G24	190,6	(38,7-464,1)	20,6	7,9	1
G28	109,8	(13,9-337,0)	11,9	26,4	1

^a) CL₅₀=concentración letal 50; ^b) LF =límites fiduciales (P<0,05); ^c) FS-CL₅₀= Factor de susceptibilidad calculado a partir de la CL₅₀; ^d) mortalidad a la dosis de campo (20 mg L⁻¹); ^e) clases de toxicidad.

Metal mobility assessment in semiarid mine tailings amended with biochar and urban compost: results of a bioassay employing a pioneer plant species

Movilidad de metales en balsas mineras enmendadas con biochar y compost urbano: resultados de un bioensayo empleando una especie vegetal pionera

O. Martínez-Oró¹*, I. Párraga-Aguado¹, M.N. González-Alcaraz², H.M. Conesa¹

¹Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, E-30203, Cartagena (Spain)

²Department of Biology & CESAM, University of Aveiro, 3810-193, Aveiro (Portugal)

*duli.martinez.o@gmail.com

Abstract

Phytomanagement allows to reduce the environmental risks of abandoned mine tailings. The aim of this work was to assess metal mobility in mine tailings amended with biochar and/or urban compost and the effectiveness of these amendments for reducing the toxicity of soil solution to a pioneer plant species (*Zygophyllum fabago*). A mesocosm experiment was performed (20 months) with mine wastes with and without amendment. Mesocosms were maintained at field capacity with tap water and drained at different times. Soil solution was regularly monitored (pH, electrical conductivity, dissolved organic carbon -DOC-, dissolved total nitrogen -TDN- and metals -Mn, Zn-), as well as drainage. A bioassay with seeds of *Z. fabago* was performed with midterm soil solution (seed germination, seedling performance). Treatments containing urban compost showed higher initial DOC and metal concentrations in solution. A decrease of DOC and metal concentrations in soil solution with time occurred due to their lixiviation in the drainage water. In spite of the higher metal pool, urban compost favoured root length due to its greater content of DOC and TDN in soil solution.

Keywords: Metal availability; mining impacts; organic amendment; soil contamination

Resumen

El fitomanejo permite reducir el riesgo ambiental de balsas mineras abandonadas. El objetivo del trabajo fue evaluar la movilidad de metales en balsas mineras enmendadas con biochar y/o compost urbano y la efectividad de las enmiendas reduciendo la toxicidad de la solución edáfica para una planta pionera (*Zygophyllum fabago*). Se llevó a cabo un experimento en mesocosmos (20 meses) con residuo minero con y sin enmienda. Los mesocosmos se mantuvieron a capacidad de campo con agua de la red y se drenaron en diferentes momentos. Se monitorizó la solución edáfica regularmente (pH, conductividad eléctrica, carbono orgánico soluble -COS-, nitrógeno total soluble -NTS- y metales -Mn, Zn-), al igual que el drenaje. Se realizó un bioensayo con semillas de *Z. fabago* con la solución edáfica de mitad del experimento (germinación de semillas, crecimiento de plántulas). Los tratamientos con compost urbano mostraron mayor concentración inicial de COS y metales en solución. Se observó un descenso temporal de la concentración de DOC y metales en la solución edáfica debido a su lixiviación en el drenaje. A pesar del mayor contenido de metales, el compost urbano favoreció la elongación de la raíz debido al mayor contenido de COS y NTS en solución.

Palabras clave: Disponibilidad de metales; impactos de la minería; enmiendas orgánicas; contaminación del suelo

1. INTRODUCTION

Phytomanagement is considered a suitable tool to reduce the environmental risks of abandoned mine tailings [1]. Plant roots can fix soil preventing the migration of metal-enriched particles from tailings bare surfaces. However, phytomanagement long-term success requires the monitoring and assessment of metal mobility since some practices employed to improve soil fertility at tailings (*e.g.* amendments) may modify metal availability, changing the toxicity risks to biota [2]. In addition, some of the amendments employed in environmental practices, such as urban composts, may contain high metal pool that needs to be assessed before their application [3]. The aim of this work was to assess metal mobility in mine tailings amended with biochar and/or urban compost and the effectiveness of the amendments for reducing the toxicity of the soil solution to a pioneer plant species (*Zygophyllum fabago*).

2. MATERIALS AND METHODS

A mesocosm experiment was performed in a greenhouse during 20 months using mine wastes from tailings of the Cartagena-La Unión mining district (Murcia, SE Spain). Environmental problems related to the presence of metal-enriched mine tailings have been previously reported in this area [4]. The mine wastes employed in the experiment showed neutral pH (~ 7.3 , 1:5 soil:water), high electrical conductivity (EC ~ 2.4 dS m⁻¹, 1:5 s:w), sandy texture, low content of total organic carbon (~ 1.4 g kg⁻¹) and total nitrogen (~ 0.7 g kg⁻¹), and high total concentrations of Zn, Mn and Pb ($\sim 6,500$ - $10,000$ mg kg⁻¹). The mine wastes were mixed with biochar and/or urban compost, resulting four treatments (n=4): mine wastes (T), mine wastes + 4% biochar (TB), mine wastes + 4% urban compost (TC), and mine wastes + 4% urban compost + 4% biochar (TCB). The urban compost employed was taken from Cartagena Municipal Waste Treatment Plant: pH ~ 7.9 (1:5 s:w); EC ~ 8.6 dS m⁻¹ (1:5 s:w); dissolved organic carbon -DOC- $\sim 25,000$ mg kg⁻¹ (1:5 s:w); dissolved total nitrogen (DTN) $\sim 3,000$ mg kg⁻¹ (1:5 s:w); total Zn, Mn, Pb and Cu concentrations ~ 500 - $1,300$ mg kg⁻¹. The biochar was provided by Piroeco S.L. (pyrolysis temperature 900 °C): pH ~ 9.9 (1:5 s:w); EC ~ 2.65 dS m⁻¹ (1:5 s:w); DOC ~ 790 mg kg⁻¹ (1:5 s:w); DTN ~ 8 mg kg⁻¹ (1:5 s:w); total Zn, Mn and Cu concentrations ~ 67 - 960 mg kg⁻¹ (Pb was not detected). All the treatments were irrigated with tap water (pH ~ 7.5 - 8.0 , EC ~ 0.45 dS m⁻¹, DOC ~ 2 mg L⁻¹, metal(loid)s concentrations < 2 μg L⁻¹ except for Zn that was ~ 15 μg L⁻¹) and maintained at field capacity. Mesocosms were let to drain at different time points.

Soil solution from the upper 20cm was taken periodically using Rhizon® samplers and pH, EC, DOC, TDN and metals (*e.g.* Mn, Zn) concentrations were measured. Drainage water was quantified and analysed. At the middle of the experiment (ninth month), soil solution from each treatment was used to perform a bioassay with seeds of *Z. fabago* in which seed germination and seedlings performance (length of roots, hypocotyl and cotyledon) were evaluated. Seeds were collected from the same mine tailing site than the mine wastes employed in the mesocosm experiment and they were cleaned and disinfected (NaClO 5%). After that, Petri dishes were prepared with filter paper and 25 seeds each, and irrigated with 5 mL of the corresponding soil solution (n=4). Then, they were incubated in a climate room (24 °C during 14 hours light -4 lux-; 20 °C during 10 hours darkness). Distilled water was used as a control. The percentage of germination was registered after 15 days, the average time for germinating was calculated, and vigour was registered after 30 days by measuring the seedling length.

3. RESULTS AND DISCUSSION

In all the treatments, the pH of the soil solution ranged between ~ 7.7 and ~ 7.9 and the EC between ~ 2.5 and ~ 4.5 dS m⁻¹ (data not shown). The DOC concentrations (Fig. 1C) were higher in TC and TCB treatments than in those without urban compost (T and TB), which could be

attributed to the greater labile organic materials contained in this amendment. A tendency to decrease DOC concentrations was observed in all the treatments (from ~43 to ~1.9 mg L⁻¹ for TC and TCB treatments; from ~6.7 to ~1.3 mg L⁻¹ for T and TB treatments). The treatments containing urban compost showed higher metal concentrations in the initial soil solution than the treatment without amendment or only biochar (1.5-2.5-fold higher for Mn and 1.5-2.0-fold higher for Zn) (Figs. 1A and 1B), probably because it contained a higher labile metal pool. In all the treatments, a decrease of metal concentrations in soil solution with time occurred. The decrease of DOC, Zn and Mn concentrations in soil solution throughout the experiment could be related to their lixiviation in the drainage water, as shown in Table 1.

Seed germination (Fig. 2A) significantly decreased when comparing distilled water (control) with soil solution treatments (from ~47% to ~10%), but no differences occurred among the tested treatments. The treatments containing urban compost showed a delay in the germination time (Fig. 2B). Urban compost improved root length: ~3.3 cm for control; ~1.9 cm for T; ~1.0 cm for TB; ~4.9-5.0 cm for TC and TCB (Fig. 2C). This could be related to the higher presence of DOC and TDN contained in this amendment: soil solution DOC concentration in the ninth month (~6-7 mg L⁻¹ in T and TB vs ~10-13 mg L⁻¹ in TC and TCB); soil solution TDN concentration in ninth month (~1-4 mg L⁻¹ in T and TB vs ~13-37 mg L⁻¹ in TC and TCB) (data not shown). No clear patterns were observed for hypocotyl and cotyledon (Fig. 2C).

4. CONCLUSIONS

Initial soluble metal concentrations in mine wastes were affected by the amendment added, although a general decrease with time occurred for all the treatments due to metal lixiviation. Urban compost favoured higher metal concentrations in soil solution than biochar, which could lead to changes in the toxicity risks to biota. However, the greater labile organic carbon and nitrogen pool of urban compost had a positive effect on the development of plant roots, which could favour its establishment in tailings.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support for this research was provided by the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain and FEDER (Project CTM2014-54029-R) and Fundación Séneca de CARM (19248/PI/14). Obdulia Martínez holds a FPI contract from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (BES-2015-075838). Dr. González-Alcaraz holds a Marie Skłodowska-Curie contract (H2020-MSCA-IF-2015, Project ID 704332).

6. REFERENCES

- [1] Robinson, B.H., Bañuelos, G., Conesa, H.M., Evangelou, M.W.H., Schulin, R., 2009. The phytomanagement of trace elements in soil. *Crit. Rev. Plant Sci.* 28:240-266.
- [2] Parraga-Aguado, I., Álvarez-Rogel, J., González-Alcaraz, M.N., Conesa, H.M. 2017. Metal mobility assessment for the application of an urban organic waste amendment in two degraded semiarid soils. *J. Geochem. Explor.* 173:92-98.
- [3] Kohler, J., Caravaca, F., Azcón, R., Díaz, G., Roldán, A. 2014. Selection of plant species–organic amendment combinations to assure plant establishment and soil microbial function recovery in the phytostabilization of a metal-contaminated soil. *Water Air Soil Poll.* 225:1930.
- [4] Conesa, H.M., Schulin, R. 2010. The Cartagena-La Unión mining district (SE Spain): a review of environmental problems and emerging phytoremediation solutions after fifteen years research. *J. Environ. Monit.* 12:1225-1233.

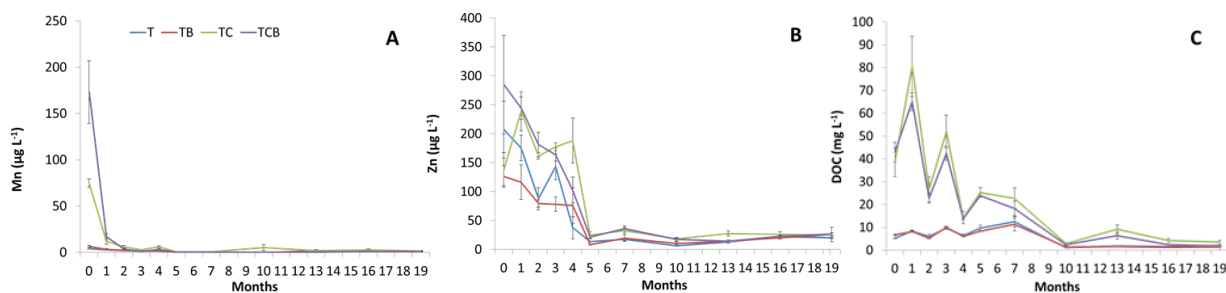


Figure 1. Evolution of soil solution concentration of Mn (A), Zn (B) and dissolved organic carbon - DOC - (C) during the experiment. Treatment codes as it follows: T (mine wastes); TB (mine wastes + 4% biochar); TC (mine wastes + 4% urban compost); TCB (mine wastes + 4% urban compost + 4% biochar). Data are average \pm standard error (n=4).

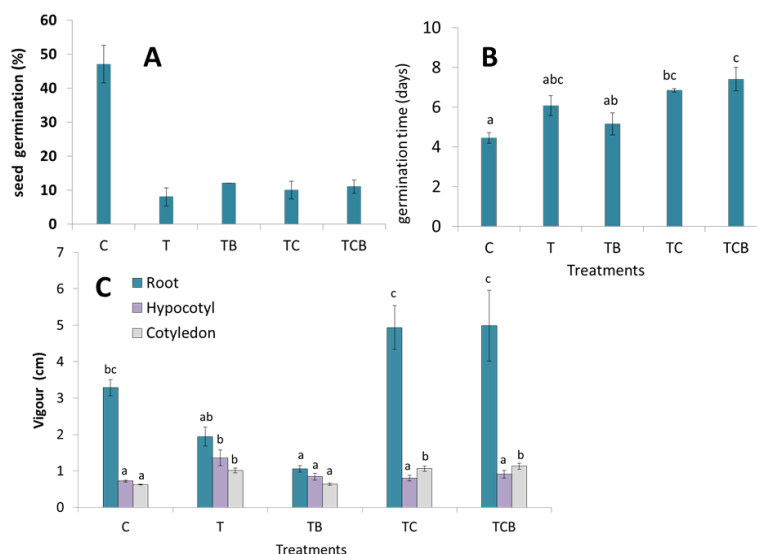


Figure 2. -Percentage of germination (A), average time for germinating (B), and the results from vigour test (C). Different letters in each column group mean significant differences among treatments (one-way ANOVA with Tukey post-hoc test, $p < 0.05$). Treatments codes as it follows: C (control with distilled water); T (mine wastes); TB (mine wastes + 4% biochar); TC (mine wastes + 4% urban compost); TCB (mine wastes + 4% urban compost + 4% biochar). Data are average \pm standard error (n=4).

Table 1. Concentrations of dissolved organic carbon (DOC), Zn and Mn in drainage water at different time points during the experiment (months 0, 10 and 19). Concentrations are expressed in relation to the drainage volume collected: DOC in mg; metals in μg . Treatment codes as it follows: T (mine wastes); TB (mine wastes + 4% biochar); TC (mine wastes + 4% urban compost); TCB (mine wastes + 4% urban compost + 4% biochar). Data are average \pm standard error (n=4). No drainage was collected for TB treatment at 10th month.

Parameter	Month	Treatment			
		T	TB	TC	TBC
DOC	0	9.72 \pm 2.60	1.66 \pm 0.46	143 \pm 37	122 \pm 15
	10	1.20 \pm 0.25	-	10.6 \pm 6.36	4.86 \pm 0.75
	19	1.48 \pm 0.26	1.25 \pm 0.27	1.85 \pm 0.65	1.33 \pm 0.27
Zn	0	80.3 \pm 5.95	18.9 \pm 4.90	224 \pm 54	124 \pm 13
	10	2.48 \pm 1.30	-	10.9 \pm 1.95	5.66 \pm 1.15
	19	10.4 \pm 2.43	10.1 \pm 2.82	8.21 \pm 2.35	6.38 \pm 1.58
Mn	0	7.28 \pm 0.65	3.16 \pm 0.78	15.9 \pm 4.20	12.6 \pm 2.53
	10	0.48 \pm 0.16	-	0.86 \pm 0.08	0.70 \pm 0.17
	19	1.65 \pm 0.25	1.04 \pm 0.38	0.92 \pm 0.36	1.06 \pm 0.22

Differences on fecundity between wild and commercial *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae) populations when reared on *Ephestia kuehniella* eggs

Diferencias en la fecundidad entre poblaciones silvestres y comerciales de *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae) con una dieta basada en huevos de *Ephestia kuehniella*

J. E. Mendoza^{1*}, V. Balanza¹, P. Bielza¹

¹Departamento de Producción Vegetal, ETSIA. Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203. Cartagena, España.

*enrique.menriv@gmail.com

Abstract

Reproduction represents a key trait to evaluate commercial mass production of a natural enemy intended for augmentative biological control. In this report, *Orius laevigatus* intraspecific variation for mean daily fecundity is explored. To this end, commercial and wild populations performance when reared on *Ephestia kuehniella* eggs is compared. In general, current commercial populations proved to be more prolific than natural ones. However, the finding of several wild populations with high fecundity and the great variability shown by this insect for this trait both support the applicability of a breeding program that leads to obtain biotypes with higher return under controlled conditions.

Keywords: Reproduction; augmentative biological control; insect breeding.

Resumen

La capacidad reproductiva resulta fundamental para evaluar la calidad de la producción de un insecto destinado al control biológico aumentativo. Este trabajo representa el primer estudio de la variación intraespecífica de la fecundidad diaria media en *Orius laevigatus*, comparando poblaciones comerciales y silvestres al alimentarlas con huevos de *Ephestia*. Los proveedores actuales han desarrollado poblaciones con una fecundidad más alta que las silvestres. Sin embargo, la alta variabilidad genética del insecto para este parámetro y el hecho de que hay poblaciones silvestres con una fecundidad notable, muestran que es posible aplicar un programa de mejora genética en este aspecto.

Palabras clave: Reproducción; control biológico aumentativo; mejora genética.

1. INTRODUCCIÓN

Orius laevigatus (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) es uno de los enemigos naturales más empleados en programas de control biológico aumentativo [1]. De hecho, de acuerdo con las principales casas comerciales productoras de entomófagos, tres especies abarcan casi el 80% del volumen de ventas en el sureste de la península, siendo *O. laevigatus* el segundo en importancia. Además, su uso está implementado en más de 15 países [2] y es especialmente relevante en el cultivo de pimiento de invernadero, en el que lleva a cabo un control eficaz del trips de las flores, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) [3].

Uno de los aspectos que mejor justifican la inversión que realizan las compañías que producen este insecto es la alta tasa de desarrollo que muestran sus poblaciones al alimentarlas con una presa factible como son los huevos de *Ephestia kuehniella* [4], siendo la fecundidad uno de los parámetros más apreciados para evaluar la calidad de la producción en masa [5]. Es aquí, por tanto, donde la mejora genética juega un papel crucial para optimizar el control biológico aumentativo, para lo cual resulta fundamental disponer de una elevada variabilidad genética [6].

Así pues, el objetivo de este trabajo consiste en explorar y explotar esta variación intraespecífica de *O. laevigatus* en cuanto a su fecundidad en condiciones óptimas, comparando el rendimiento de los insectos de las principales compañías productoras con el de aquellos procedentes de una serie de poblaciones recolectadas en estado silvestre. Estos ensayos nos permitirán seleccionar aquellos biotipos con un rendimiento más elevado, lo que significará el inicio de un proceso de mejora que acabe dando lugar a una raza con una capacidad de desarrollo más elevada y por lo tanto más idónea para su producción masiva en biofábricas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Poblaciones de *Orius laevigatus*.

Para estudiar la variabilidad de la fecundidad de *Orius laevigatus* se parte de cinco poblaciones comerciales del insecto suministradas por Koppert®, InVivo®, Biobest®, Agrobío® y Surinver®, además de 25 poblaciones silvestres recolectadas en distintas áreas de la cuenca mediterránea entre agosto de 2012 y diciembre de 2015 y una mezcla de todas las poblaciones silvestres, a priori con una mayor variabilidad genética (Tabla 1). El mantenimiento de estas poblaciones se llevó a cabo mediante la metodología de cría descrita por Mendoza et al. [7].

2.2 Métodos de bioensayo.

Para realizar los bioensayos se siguió la metodología descrita por Mendoza et al. [7]. Se partió de adultos recién emergidos de las distintas poblaciones ensayadas y se les alimentó *ad libitum* con huevos de *E. kuehniella* durante 3-5 días para que tuviera lugar la cópula y el periodo de preoviposición. Los supervivientes se sexaron, individualizando a las hembras para medir su fecundidad durante 10 días mientras eran alimentadas *ad libitum* con huevos de *Ephestia*.

2.3 Tratamiento estadístico.

Los bioensayos se realizaron al azar, con 50 réplicas por población (n=50), y descartando a aquellas hembras que no pusieron huevos durante al menos 7 días. Se estudió la diferencia de medias entre poblaciones comerciales y silvestres con una prueba t-Student, así como entre todas las poblaciones mediante un ANOVA. Cuando se observaron diferencias significativas entre poblaciones, se separaron sus medias mediante un test de comparaciones múltiples. Todos los test se evaluaron al 95% de confianza ($p < 0,05$) [8-9].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como puede observarse en la Tabla 1, todas las poblaciones ensayadas superaron los 5 huevos por hembra y día durante los 10 primeros días, con medias comprendidas entre los 5,2 huevos por hembra y día de la población silvestre recolectada en Cabo de Gata y los 10,5 de la población comercial Surinver®. Estos resultados concuerdan con los de Cocuzza et al. [10] en un ensayo realizado a 25 °C con hembras de Koppert® alimentadas con huevos de *E. kuehniella* para las que registraron un pico de 6 huevos/hembra-día durante la primera semana de oviposición.

En cuanto al rendimiento de las poblaciones silvestres y comerciales evaluadas, la fecundidad diaria media registrada es superior en estas últimas ($t=10,775$; $g.l.=1548$; $P<0,001$), con un valor de 6,9 huevos/hembra-día ($SD=2,3$) para las poblaciones silvestres y de 8,6 ($SD=2,5$) para las comerciales. Esto podría deberse a que en biofábricas se alimenta a las poblaciones *ad libitum*, con lo que las hembras más fecundas desarrollan una progenie más abundante que se impondría sobre la de las menos fecundas, elevando el potencial biótico en cada generación. Este proceso de selección no se da en estado silvestre, donde los individuos están sometidos a las fluctuaciones del medio. No obstante, sí que se han registrado valores elevados de fecundidad en algunas poblaciones silvestres, como la recolectada en Puerto de la Mora (Tabla 1), con una media que no difiere significativamente de la obtenida para las poblaciones comerciales con mayor fecundidad, Agrobio® y Surinver® ($F=14,665$; $g.l.=30$; $P<0,001$). Se tiende a presuponer cierta homogeneidad entre las poblaciones de los distintos proveedores, ya que se introducen individuos silvestres regularmente en el sistema de cría para evitar la consanguinidad y la deriva genética. Es por eso que los caracteres biológicos y ecológicos de estas especies no se desvían de los valores medios propios de la especie, seleccionados en la evolución para su rendimiento óptimo en sus condiciones naturales [11]. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio muestran una elevada variabilidad genética en cuanto a la fecundidad de *O. laevigatus*, lo que indica que las poblaciones que se reproducen en biofábricas son susceptibles de ser mejoradas.

4. CONCLUSIONES

A pesar de que las poblaciones de *Orius laevigatus* de las principales casas comerciales evaluadas muestran en general una fecundidad más elevada que las recolectadas en estado silvestre, es posible encontrar algunas excepciones que demuestran que el rendimiento de este insecto en el sistema de producción en masa es susceptible de ser mejorado, lo cual se ve apoyado por la elevada variabilidad intraespecífica que muestra el insecto para este parámetro.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradecer al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por la concesión de un contrato FPU y a M. Inglés y M. Chaca por su inestimable ayuda técnica.

6. REFERENCIAS

- [1] Vergara L., Giacometti R., Cupo P. 2009. Integrated control in peppers: functional and advisable. *Informatore Agrario* 65(20): 53-58.
- [2] van Lenteren J.C. 2012. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. *BioControl* 57(1): 1-20.
- [3] van der Blom J. 2017. Control Biológico en cultivos hortícolas en Almería: balance después de 10 años. *Boletín de la Sociedad Española de Entomología Aplicada* 2: 34-38.
- [4] Bonte M., De Clercq P. 2008. Developmental and reproductive fitness of *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae) reared on factitious and artificial diets. *J. Econ. Entomol.* 101: 1127-1133.
- [5] Portilla M., Morales-Ramos J.A., Rojas M.G., Blanco C.A. 2014. Life Tables as Tools of Evaluation and Quality Control for Arthropod Mass Production, In: *Mass Production of Beneficial Organisms*, 1st ed, J.A. Morales-Ramos, M.G. Rojas, D.I. Shapiro-Ilan, eds. (Academic Press, San Diego, CA, U.S.A.) Pp. 241-275.
- [6] Lommen S.T., Jong P.W., Pannebakker B.A. 2017. It is time to bridge the gap between exploring and exploiting: prospects for utilizing intraspecific genetic variation to optimize arthropods for augmentative pest control—a review. *Entomol. Exp. Appl.* 162(2): 108-123.

[7] Mendoza J.E., Balanza V., Sánchez-Martínez M.J., Bielza P. 2014. Variabilidad de la tolerancia a la alimentación sin presa en distintas poblaciones mediterráneas de *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae). In: III Workshop on Agri-Food Research. F. Artés-Hernández, M. Egea-Cortines, A. Palop-Gómez, S. Bañón-Arias, P. Bielza, eds. (Universidad Politécnica de Cartagena, Cartagena, España). Pp. 155-158.

[8] Statacorp. 2005. Stata statistical Software/ Release 9. StataCorp LP.

[9] Spss Inc. 2006. Guide to data analysis, version 15.0. Spss Inc.

[10] Cocuzza G.E., De Clercq P., Lizzio S., van de Veire M., Degheele D., Vacante V. 1997. Life tables and predation activity of *Orius laevigatus* and *Orius albidipennis* at three constant temperatures. Entomol. Exp. Appl. 85 (3): 189-198.

[11] Bielza, P. 2016. Next generation biological control agents: selective breeding for tolerance to environmental stress. Presented at BINGO-ITN workshop 'Optimizing Biological Control' (Valencia, España, IVIA).

Tablas

Tabla 1. Fecundidad diaria media durante los diez primeros días (FDM₁₀) en condiciones óptimas para distintas poblaciones silvestres y comerciales de *Orius laevigatus*.

Tipo de población	Población (Origen)	N ^a	FDM ₁₀ ^b	Tipo de población	Población (Origen)	N ^a	FDM ₁₀ ^b
Silvestre	Cabo de Gata (Almería)	50	5,2 ± 2,6 a	Silvestre	Mérida (Badajoz)	50	6,9 ± 2,3 bcdefg
Silvestre	Moreira (Pontevedra)	50	5,6 ± 1,8 ab	Silvestre	Cazorla (Jaén)	50	7,4 ± 2,3 cdefgh
Silvestre	Ruidera (Ciudad Real)	50	6,0 ± 1,9 abc	Silvestre	Palermo (Italia)	50	7,5 ± 2,8 cdefgh
Silvestre	La Zenia (Alicante)	50	6,2 ± 2,0 abcd	Silvestre	Policoro (Italia)	50	7,7 ± 2,1 defgh
Silvestre	Mezcla	50	6,2 ± 1,7 abcd	Silvestre	Hellín (Albacete)	50	7,7 ± 1,9 defgh
Silvestre	Rethymno (Grecia)	50	6,2 ± 2,0 abcd	Silvestre	Cabrils (Barcelona)	50	8,0 ± 2,5 efgh
Silvestre	Carmona (Sevilla)	50	6,2 ± 1,6 abcd	Silvestre	Alcobendas (Madrid)	50	8,3 ± 2,1 fgh
Silvestre	C. de Almanzora (Almería)	50	6,2 ± 2,5 abcd	Silvestre	Islantilla (Huelva)	50	8,4 ± 2,6 gh
Silvestre	Teruel (Teruel)	50	6,3 ± 2,0 abcd	Silvestre	Portonovo (Pontevedra)	50	8,6 ± 1,8 h
Silvestre	Samaria (Grecia)	50	6,3 ± 2,1 abcd	Silvestre	Puerto de la Mora (Granada)	50	8,9 ± 2,4 hi
Silvestre	Cartagena (Murcia)	50	6,4 ± 2,2 abcde				
Silvestre	Corrubedo (La Coruña)	50	6,5 ± 2,1 abcde	Comercial	InVivo	50	7,5 ± 1,8 cdegh
Silvestre	Méntrida (Toledo)	50	6,5 ± 1,9 abcde	Comercial	Biobest	50	8,2 ± 2,2 fgh
Silvestre	Acate (Italia)	50	6,7 ± 1,9 abcdef	Comercial	Koppert	50	8,4 ± 3,2 gh
Silvestre	Logroño (La Rioja)	50	6,7 ± 2,2 abcdef	Comercial	Surinver	50	8,7 ± 2,1 h
Silvestre	Guadalupe (Cáceres)	50	6,9 ± 2,1 bcdefg	Comercial	Agrobio	50	10,5 ± 2,0 i

a: número de hembras ensayadas. *b*: Fecundidad Diaria Media, expresada en número de huevos puestos por cada hembra al día (medias ± SE seguidas por la misma letra no son significativamente distintas, $p > 0,05$, Test de Tukey).

ORAL SESSION III:
Agroforestry Engineering

Producing lettuce in soil-based or in soilless outdoor systems. Which is more profitable?

Producir lechugas en sistema al aire libre en suelo o sin suelo. ¿Cuál es más rentable?

M.A Martínez-Maté*, B. Martín-Górriz, J. F. Maestre Valero

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena, Spain.

*miguelmartinezmate@gmail.com

Abstract

This work presents an economic assessment of two lettuce production systems, soil cultivation (SC) and nutrient film technique (NFT). In the NFT system, the yield, the water productivity, the total cost, the revenue and the profit were 5.5, 2.6, 6.2, 5.7 and 3.1 times higher than in the SC system, respectively. The financial assessment showed a net present value in the NFT system 3.1 times higher than in the SC system, however, the internal rate of return in the SC system was 4 times higher than in the NFT system. In this sense, the higher investment and operational costs in the NFT system led to a lower ratio of profit/total costs (0.079 versus 0.134).

Keywords: Nutrient film technique; water productivity; net present value; cost-benefit analysis.

Resumen

Este trabajo presenta una evaluación económica de dos sistemas de producción de lechuga, Cultivo en Suelo (CS) y Técnica de Película Nutritiva (TPN). En el sistema TPN, el rendimiento, la productividad del agua, el costo total, los ingresos y el beneficio fueron 5.5, 2.6, 6.2, 5.7 y 3.1 veces superior que en el sistema CS, respectivamente. La evaluación financiera mostró un valor presente neto en el sistema TPN 3.1 veces superior que el sistema CS, sin embargo, la tasa interna de retorno en el sistema CS fue 4 veces superior que en el sistema TPN. En este sentido, los mayores costos operacionales y de inversión en el sistema TPN permiten una menor proporción de ganancias/costos totales (0.079 contra 0.134).

Palabras clave: Técnica de película nutritiva; productividad del agua; valor presente neto; análisis coste-beneficio.

1. INTRODUCCIÓN

El sureste de España es una de las regiones con mayor déficit hídrico en Europa y la primera en España; déficit estructural de 400 hm³ por año [1]. En esta región el consumo agrícola representa más del 80% de los recursos hídricos. Las malas prácticas agrícolas que se llevan a cabo actualmente en zonas de regadío pueden provocar problemas de contaminación del suelo y aguas con fertilizantes y fitosanitarios, con la consiguiente degradación medio ambiental del ecosistema agrario [2].

El uso de tecnologías agrícolas innovadoras como el cultivo hidropónico, y más concretamente el sistema Técnica de Película Nutritiva (TPN), que permite recircular el agua aplicada a las plantas, es una alternativa para mantener la agricultura en estas regiones.

El objetivo principal de este trabajo es evaluar económicamente la viabilidad de la implementación del sistema TPN frente al sistema Cultivo en Suelo (CS).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la Cuenta del Segura, localizada en el sudeste de España. Se seleccionó el cultivo de lechuga ya que es el vegetal de invierno con mayor producción y superficie de cultivo en la región.

Los sistemas de cultivo se clasificaron en las siguientes categorías: materias primas, mano de obra y maquinaria. Las materias primas incluyen agua de riego, electricidad, combustible, fertilizantes, pesticidas y plántulas. Para el sistema CS los datos se obtuvieron de agricultores del Campo de Cartagena y AMOPA (2006). Para el sistema TPN, los datos se obtuvieron de fincas comerciales existentes en la Cuenca del Segura.

El precio de las materias primas fue de 0.19 €/m³ para el agua de riego, 0.11 €/kWh la electricidad y 1 €/l el combustible. El costo de la mano de obra fue de 8 €/hora. Los costos de fertilizantes, pesticidas y maquinaria varían según el tipo de 0.37 €/kg a 1,6 €/kg, de 12.4 €/kg a 207 €/kg y de 24 €/h a 39 €/h respectivamente.

En el sistema CS se han considerado 2 ciclos por año mientras que en el sistema TPN se han considerado 9 ciclos por año.

Los beneficios totales se determinaron como el producto entre la producción de lechuga y el precio de venta en la región (0.04 €/lechuga cuando el peso fue menor a 100 gr y 0.09 €/lechuga cuando el peso fue mayor de 120 gr) [3].

Los costos totales se clasificaron en costos de inversión y costos operacionales. Los costos operacionales a su vez se clasificaron en materias primas, maquinaria y labor humana.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El rendimiento y la productividad del agua en el sistema TPN fue 5.5 y 2.6 veces superior al sistema CS (Tabla 1).

El costo total, los ingresos, los beneficios y el valor presente neto (VPN) en el sistema TPN fue 6.2, 5.7, 3.1 y 2.8 veces superior al sistema CS. Sin embargo, la tasa interna de retorno (TIR) fue 4.6 veces superior en el sistema CS frente a sistema TPN (Tablas 2 y 3).

El rendimiento y los beneficios obtenidos en el sistema CS han sido inferiores a los obtenidos por Capra et al (2008) en Sicilia [4].

Los beneficios/costos totales en los sistemas CS y TPN fueron 0.191 y 0.096, respectivamente, lo que muestra la mayor rentabilidad del sistema CS. El costo de equilibrio fue similar en el sistema CS (0.504 €/kg) y TPN (0.493 €/kg). Los costos de inversión en el sistema CS representaron el 2.2 % de los costos totales, mientras que en el sistema TPN representaron el 16.8 %. El mayor coste operacional en ambos sistemas fue la labor humana (44.6 % en sistema CS y 57.2 % en sistema TPN), seguido de materias primas (39.7 % y 38.8 %) y maquinaria (12.3 % y 2.8 %). Los resultados obtenidos en el sistema CS fueron muy similares a los obtenidos por Rezende et al (2011) en San Paulo [5] y Galinato y Miles (2013) [6] en Washington. Estos resultados indican que para reducir los costes operacionales, la eficiencia en la labor humana ha de incrementarse.

4. CONCLUSIONES

La mayor relación beneficios/costos totales y tasa interna de retorno (TIR) en el sistema CS indica una mayor rentabilidad de éste frente al sistema TPN. La implementación del sistema TPN implica un incremento notable de los costos de inversión y costos operacionales respecto al sistema CS. Sin embargo, en áreas con escasa disponibilidad de agua o suelo agrícola y/o la necesidad de preservar áreas ambientalmente vulnerables, el sistema TPN podría posicionarse sobre el sistema CS, debido al mayor rendimiento y productividad del agua.

5. AGRADECIMIENTOS

Fundación Séneca – Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia [19280/PI/14] y la Comisión Europea (LIFE16 ENV/ES/000341, DESEACROP Project) por su apoyo.

6. REFERENCIAS

- [1] CHS. 2015. Confederación Hidrográfica de la Cuenca del Segura. 2015. Plan Hidrológico de la Demarcación del Segura 2015-2021. Murcia, Spain. 762.
- [2] Killebrew, K, Wolff, H., 2010. Environmental Impacts of Agricultural Technologies. Evans School of Public Affairs. University of Washington. <http://econ.washington.edu/files/2014/06/2010-Environmental-Impacts-of-AgTechnologies.pdf> (accessed on 1 December 2014).
- [3] CARM, 2017. Precios agrarios en origen [https://www.carm.es/web/pagina?IDCONTENIDO=1210&IDTIPO=100&RASTRO=c212\\$m1230](https://www.carm.es/web/pagina?IDCONTENIDO=1210&IDTIPO=100&RASTRO=c212$m1230).
- [4] Capra, A., Consoli, S., Russo, A., Scicolone, B., 2008. Integrated agro-economic approach to deficit irrigation on lettuce crops in Sicily, Italy. J. Irrig. Drain. Eng., 134(4), 437-445.
- [5] Rezende, B.L.A., Cecílio-Filho, A.B., Barros-Junior, A.P., Porto, D.R., Martins, M.I. 2011. Economic analysis of cucumber and lettuce intercropping under greenhouse in the winter-spring. An. Acad. Bras. Cienc. 83(2), 705-17.
- [6] Galinato, S.P., Miles, C.A., 2013. Economic profitability of growing lettuce and tomato in western Washington under high tunnel and open-field production systems. Hortech. 23(4), 453-461.

Tabla 1. Materias primas, maquinaria, labor humana, rendimiento, productividad del agua, duración de ciclo y densidad de plantación en los sistemas CS y TPN.

Item	Unidades	Cultivo en Suelo (CS)	Técnica de Película Nutritiva (TPN)
1. Materias primas			
1.1 Agua de riego	m ³ /ha	3,700	6,750
1.2 Electricidad	kW·h/ha	629	29,808
1.3 Combustible	L/ha	641	132
1.4 Fertilizantes	kg/ha	10,780	9,999
1.5 Pesticidas	kg/ha		
Fungicidas		17	-
Insecticidas		6	9.25
Herbicidas		11	-
1.6 Plántulas	Unidades/ha	310,000	1,485,000
2. Maquinaria	h/ha	73	116
3. Labor humana	h/ha	1,024	6,912

4. Rendimiento	Kg/ha	42,854	235,595
5. Productividad del agua	kg/m ³	13.8	36.4
6. Duración de ciclo	Días	154	270
7. Densidad de plantación	plantas/m ²	15.5	16.5

Tabla 2. Costos, ingresos y beneficios en los sistemas CS y TPN.

Item	Unidades	Cultivo en Suelo (CS)	Técnica de Película Nutritiva (TPN)
Inversión		416	19,483
Costos operacionales		18,360	96,607
Materias primas		7,306	37,527
Maquinaria		2,261	2,784
Labor humana	€/ha/año	8,192	55,296
Alquiler de tierra		600	1000
Costo total		18,776	116,089
Ingresos		22,360	127,221
Beneficios		3,584	11,132
Beneficios/Costos operacionales	-	0.195	0.115
Beneficios/Costos totales	-	0.191	0.096
Costo de equilibrio	€/kg	0.504	0.493

Tabla 3. Valor Presente Neto, Tasa Interna de Retorno y Amortización en los sistemas CS y TPN.

Item	Unidades	Cultivo en Suelo (CS)	Técnica de Película Nutritiva (TPN)
Valor Presente Neto (VPN)	€/ha	47,254	132,463
Tasa Interna de Retorno (TIR)	%	67.4	14.5
Amortización	años	3	3

Safety device for the automatic operation of roll over protective structure for agricultural tractors

Dispositivo de seguridad para el accionamiento automático de un arco antivuelco en tractores

D. Ojados Gonzalez^{1*}, B. Martin-Gorriz², I. Ibarra Berrocal¹

¹Servicio de Apoyo a la Investigación Tecnológica, Universidad Politécnica de Cartagena, Plaza del Hospital s/n, 30202 Cartagena, Spain.

²Dpto. de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena, Spain.

*lola.ojados@sait.upct.es

Abstract

An inadequate use of the deployable Roll Over Protective Structure (ROPS) in agricultural tractors contributes to fatalities in rollover events. To resolve this problem, an automatically deployable ROPS was designed, constructed and tested. The prototype, HydraROPS, established two assistance levels, manual activation on the board and automatic change to the operative position occurs in situations of impending rollover, without the intervention of the driver. In this level, it automatically sends a SMS with the GPS location to contact emergencies. The tractor's hydraulic power was used to move the protective structure. In order to increase the deployment speed of ROPS, a pressure accumulator was included in the hydraulic circuit. The deployment time of the ROPS without and with the pressure accumulator were 2.599 s and 0.743 s respectively, reducing the deployment time of ROPS by 71%; HydraROPS can be installed on tractors equipped with a certified rollover protective structure.

Keywords: ROPS; tractor safety; overturn; Injury; emergency notification.

Resumen

Un uso inadecuado de la estructura abatible de protección (ROPS) en los tractores agrícolas es la principal causa de accidentes por vuelco. Para resolver este problema, se ha diseñado, construido y ensayado un dispositivo de accionamiento automático del ROPS. El prototipo, HydraROPS, se basa en dos modos de actuación, uno manual y otro automático sin la intervención del conductor cuando el vuelco es inminente. En este modo, además se envía un SMS con la ubicación GPS para contactar con emergencias. Para el accionamiento de la estructura de protección se emplea el circuito hidráulico del tractor. Con el fin de aumentar la velocidad de activación del ROPS, se acopló un acumulador de presión en el circuito hidráulico. Los tiempos de despliegue del ROPS sin y con el acumulador de presión fueron 2,599 s y 0,743 s respectivamente reduciendo el tiempo de despliegue en un 71%; HydraROPS se puede instalar en tractores equipados con estructuras de protección homologadas.

Palabras clave: ROPS; seguridad del tractor; vuelco; lesión; notificación de emergencia.

1. INTRODUCCIÓN

Los accidentes por vuelco de tractor son una de las principales causas de muerte en la agricultura [1]. Entre 2004 y 2008 se produjeron 272 accidentes mortales en España, un 70% de los relacionados con el uso de maquinaria agrícola. Desde 2005, el ISSL de la CARM realiza el registro y análisis de estos accidentes, con el objetivo de conocer su número y sus causas. Entre 2005 y 2017 se produjeron 60 accidentes en la Región de Murcia, en 34 de ellos el conductor falleció [2]. Aunque el tractor disponía de arco, en un 76,9% éste estaba abatido.

Los arcos antivuelco son manuales, el agricultor tiene que levantar y bajar el arco en función de las características del cultivo [3]. Una baja percepción del riesgo hace que se lleve el arco abatido con frecuencia. Existen otras soluciones para automatizar este sistema [4-6].

El accidente puede ocurrir en cualquier momento del día, se trata de un trabajo al aire libre, solitario y alejado de poblaciones pudiendo transcurrir varias horas desde el accidente hasta su descubrimiento.

El accidente más grave se produce cuando el vuelco es de más de 90° y el conductor queda atrapado. Hay dos tipos de vuelco: lateral (el más frecuente) y hacia atrás [7]. Los factores que influyen son: pendientes pronunciadas, trabajar cerca de cunetas, taludes o acequias, velocidad excesiva, especialmente en giros, manipular objetos que elevan el centro de gravedad del conjunto, utilizar puntos de anclaje altos.

Los objetivos han sido diseñar y construir, para tractores que disponen de arco de seguridad abatible, un sistema de accionamiento del arco que se active (i) automáticamente cuando el tractor supera un determinado ángulo de inclinación, (ii) a voluntad por el tractorista cuando perciba que se encuentra en una situación de riesgo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Requisitos de diseño

HydraROPS está formado por dos subsistemas: electrónico e hidráulico.

Los requisitos para el subsistema de control electrónico son los siguientes:

- El conductor podrá elevar el ROPS cuando reconozca una situación de riesgo.
- El arco se elevará sin intervención del conductor si el vuelco es inminente.
- A partir de condiciones de riesgo, el conductor será avisado con una señal audible.
- Si se produce un vuelco, el sistema enviará la localización a la central de emergencias.
- La información relacionada con cada accionamiento será registrada y grabada.

Los requisitos para el subsistema hidráulico son los siguientes:

- El tiempo de despliegue será el menor posible para evitar vuelcos superiores a 90°.
- El arco permanecerá en posición vertical cuando el tractor esté apagado.
- Además, HydraROPS debe ser lo más económico posible para promover su instalación por los agricultores en sus tractores.

Las ventajas de usar energía hidráulica son (1) la fuente de energía está en todos los tractores, reduciéndose el coste; (2) puede ser utilizado tantas veces como sea necesario, (3) ocupa poco espacio y no interfiere con otros usos.

2.2 Subsistema electrónico

Circuito del microcontrolador: El montaje de los componentes es modular. Se ha utilizado un microcontrolador Arduino ATmega2560. El software se programó en lenguaje C. La Fig. 1.a muestra el diagrama de flujo del algoritmo utilizado por el microcontrolador.

Unidad de medida inercial: La unidad de medición inercial PMU6050 (acelerómetro y giroscopio) detecta aceleraciones estáticas y dinámicas permitiendo calcular el ángulo en el que está el tractor. Con un filtro Kalman se eliminan los fenómenos de ruido. El filtro consiste en un conjunto de ecuaciones matemáticas para minimizar el error.

Módulo de comunicación: El módulo de comunicación SIM908 se utilizó para conectar a la red GSM y recibir GPS. Trabaja en frecuencias EGSM 900 MHz/DCS 1800 MHz y GSM850 MHz/PCS 1900 MHz. También es compatible con la tecnología GPS para navegación por satélite. Permite rastrear siempre que haya cobertura. Cuando se produce un vuelco, el módulo GSM/GPRS se activa y envía un mensaje corto (SMS) con las coordenadas geográficas de la ubicación del tractor consiguiéndose una rápida respuesta del personal de emergencias.

Tarjeta de memoria: Se ha utilizado la tarjeta de memoria Arduino microSD Shield para registrar los datos. Cuando HydraROPS se acciona, se registran los siguientes datos: tiempo, ángulos de pitch y de roll, coordenadas geográficas, posición del arco (horizontal o vertical) y modo de activación. Estos datos son útiles para reconstruir accidentes/incidentes.

Módulo de relé: Se utiliza para operar el subsistema hidráulico. Los contactos del relé se conectaron a una válvulas de solenoide que, cuando se activan, despliegan los cilindros hidráulicos del HydraROPS. Se utilizaron relés de estado sólido porque son más robustos.

2.3. Subsistema hidráulico

HydraROPS se ha acoplado con un arco desplegable frontal. La Fig. 1.b muestra el circuito hidráulico de HydraROPS. Dos cilindros hidráulicos (CHB 50/30 – 150, longitud de movimiento de 150 mm, diámetro exterior de 50 mm, pistón diámetro de varilla de 30 mm y presión máxima de operación de 20 MPa) uno a cada lado del arco, soportados en una estructura anclada al chasis del tractor. Para disminuir el tiempo de despliegue se incluyó un acumulador de presión vesical en el circuito hidráulico que además permite una activación con el tractor apagado.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha construido un dispositivo capaz de accionar el arco de modo manual y automático. Tras En las condiciones de motor a ralentí (888 rpm) y a altas revoluciones (1477) se han analizado imágenes filmadas a alta velocidad obteniéndose resultados muy semejantes ya que el tiempo de respuesta del sistema de control hidráulico-electrónico, una vez que se ha detectado el ángulo de consigna, varía entre 102 y 112 mili segundos en uno y otro caso.

4. CONCLUSIONES

El desarrollo facilita la utilización del arco de seguridad. La instalación del arco combinada con el uso del cinturón de seguridad evita el aplastamiento del conductor.

La activación del arco es automática cuando las condiciones son peligrosas, de esta forma la seguridad no depende del individuo. El dispositivo permite el accionamiento del arco a voluntad desde el asiento, de forma sencilla y cómoda, cuando el tractorista percibe que se encuentra en riesgo de vuelco.

El sistema de control envía un SMS con la ubicación en caso de vuelco gracias a la tecnología GPS. Se consigue así que se active de forma inmediata el protocolo de emergencias.

La respuesta del sistema ha sido satisfactoria, desplegándose el arco antes de finalizar el vuelco. El tiempo de despliegue en un tractor Massey Ferguson modelo 147 es inferior a 0,8 s.

5. AGRADECIMIENTOS

Al ISSL de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia por la financiación del proyecto.

6. REFERENCIAS

- [1] Arana I., Mangado J., Arnal P., Arazuri S., Alfaro J.R., Jarén C. 2010. Evaluation of risk factors in fatal accidents in agriculture. Spanish Journal of Agricultural Research, 8 (3), 592-598.
- [2] Martín Gorriz B., Ibarra Berrocal I., Mínguez Samper A., Morente Sánchez A. 2012. Accidentes por vuelco de tractor de la Región de Murcia: propuestas para su reducción. Formación de Seguridad Laboral, 123, 70-71.
- [3] Ponce de Leon J.L. 2008. Estructuras de protección para tractores agrícolas. Homologación y uso. Jornada de seguridad en el uso de los tractores y de la maquinaria agrícola. Lleida, 25 de septiembre de 2008.
- [4] Silleli H., Dayıoglu M.A., Gültekin A., Saranlı G., Yıldız M.A., Akay E., Ekmekçic K. 2008. Anchor mechanism to increase the operator clearance zone on narrow-track wheeled agricultural tractors: Static and field upset test results. Biosystems Engineering, 99 (2), 196-204.
- [5] Ballesteros T., Arana I., Pérez A., Alfaro J.R. 2013. E2D-ROPS: Development and tests of an automatically deployable, in height and width, front-mounted ROPS for narrow-track tractors. Biosystems Engineering, 116 (1), 1-14.
- [6] Powers J.R., Harris J.R., Etherton J.R., Snyder K.A., Ronaghi M., Newbraugh B.H. 2001. Performance of an automatically deployable ROPS on ASAE tests. Journal of Agricultural Safety and Health, 7(1), 51-61.
- [7] Hathaway L., Kuhar J. eds. 1994. Farm and ranch safety management. Moline, IL: Deere and Company Service Publications.

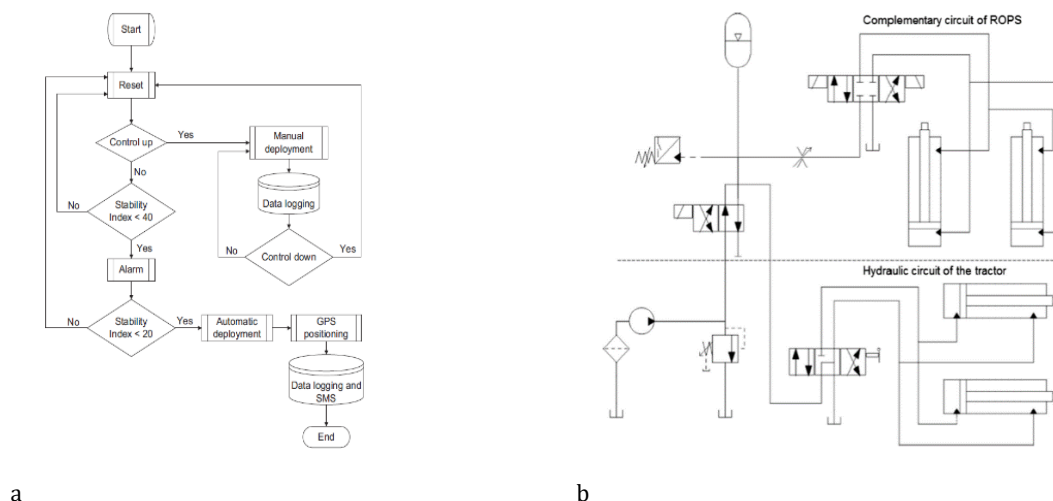


Figura 1. (a) Diagrama de flujo del algoritmo utilizado por el microcontrolador. (b) Circuito hidráulico de HydraROPS

Design and 3D prototyping of four portable buried weighing lysimeters for horticultural crops

Diseño y prototipado en 3D de cuatro lisímetros de pesada portables enterrados para cultivos hortícolas

J.A. Nicolás-Cuevas*¹, D. Parras-Burgos², L. Ruiz-Peñalver¹, J.M. Molina-Martínez¹

¹Grupo de Investigación de Ingeniería Agromótica y del Mar. Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena, Murcia. Spain.

²Departamento de Expresión Gráfica. Universidad Politécnica de Cartagena. C/ Doctor Fleming, s/n, 30202 Cartagena, Murcia. Spain.

*juan.nicolas@upct.es

Abstract

In areas with scarce water resources, the management of water is essential for achieving an economically sustainable agriculture. Among the technologies available, lysimeters are one of the most reliable to determine crop evapotranspiration and improve irrigation efficiency. This communication shows four prototypes of weighing lysimeters designed as modular systems of small dimensions for its assembly in horticultural plantations. In the various prototypes, modifications have been introduced to facilitate their installation and maintenance, improving their performance and achieving a transportable prototype for easy assembly.

Keywords: Water resources; precision agriculture; evapotranspiration; construction.

Resumen

En zonas con escasez de recursos hídricos, la gestión del agua es imprescindible para lograr una agricultura económicamente sostenible. Entre las tecnologías disponibles, los lisímetros de pesada son una de las más fiables para determinar la evapotranspiración de los cultivos y mejorar la eficiencia del riego. En esta comunicación se muestran cuatro prototipos de lisímetros de pesada diseñados como sistemas modulares de reducidas dimensiones para su uso en plantaciones hortícolas. En los distintos prototipos se han introducido modificaciones que facilitan su instalación y mantenimiento, mejorando sus prestaciones y consiguiendo un prototipo transportable de fácil montaje.

Palabras clave: Recursos hídricos; agricultura de precisión; evapotranspiración; construcción.

1. INTRODUCCIÓN

Una gestión eficiente de los recursos hídricos permite mejorar la productividad y calidad de las cosechas, permitiendo un uso racional del agua y de la energía. Existen diversos métodos para medir o estimar la evapotranspiración de un cultivo (ET_c), siendo el lisímetro de pesada el procedimiento que proporciona los valores más precisos de ET_c [2, 4].

Los lisímetros son artefactos que contienen una porción de suelo, independizado hidrológicamente del suelo circundante, en el cual resulta posible controlar y medir los diferentes términos que intervienen en el balance hídrico. En los lisímetros de pesada, el incremento o pérdida de agua se mide por el cambio en la masa del recipiente en el que se encuentra el suelo.

Actualmente, existen numerosos métodos y herramientas en el ámbito agronómico para determinar el peso de los cultivos que comprenden una gran variedad de modelos, funcionamiento y precios [3, 5, 6]. Habitualmente, los lisímetros son difíciles de manejar, costosos de construir y su utilización y mantenimiento requieren de un especial cuidado, por lo que su uso suele estar restringido a centros de investigación [1].

En la presente comunicación, se exponen las modificaciones que se han ido realizado en cuatro prototipos de lisímetros de pesada para su uso en explotaciones agrícolas destinadas a cultivos hortícolas, cuyos objetivos principales se basan en facilitar la instalación, mejorar la transportabilidad y obtener una alta precisión que permita cuantificar la evapotranspiración por el cambio de peso durante intervalos pequeños de tiempo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los lisímetros de pesada propuestos consisten en una estructura formada por chapas y barras de acero inoxidable a modo de contenedor exterior. Esta estructura de contención del terreno (estructura principal) descansa sobre una base rígida que transmite las cargas al terreno. Como el recipiente lisimétrico está independizado de su entorno, los flujos laterales y de ascenso capilar son nulos, de modo que los términos de la expresión de balance hídrico pueden ser determinados con precisión. Para drenar y medir el agua, que se filtra a través del volumen de suelo confinado, se utiliza un depósito de drenaje. Para conocer las variaciones en el contenido de agua, en la masa de suelo y el depósito de drenaje, se utiliza un sistema de pesaje. La precipitación y el riego se miden mediante pluviómetros y métodos volumétricos convencionales, de esta forma, el lisímetro proporciona una medida directa de la evapotranspiración en el período considerado.

Dentro del proyecto de investigación “Sistema de PROgramación Automática del Riego por LISimetría de Pesada y Salinidad del Suelo, con supervisión remota del estado vegetativo del cultivo” (PROLISI), se han diseñado cuatro modelos de lisímetro de pesada hasta obtener un modelo más compacto y transportable.

Modelo LP-1: con unas dimensiones generales de 113x73x94 cm (longitud x anchura x altura). Los perfiles que conforman la estructura de todo el modelo son laminados de sección cuadrada de 50x50 mm y las chapas que la recubren son de espesor 2 mm. Los materiales utilizados son de acero inoxidable AISI 316 (figs. 1a y 2a).

Modelo LP-2: con unas dimensiones generales de 113x73x74 cm. Los perfiles son de sección cuadrada de 50x50 mm. En este modelo se han eliminado los perfiles verticales de la estructura que sostiene las células de carga para reducir la altura del modelo (Figs. 1b y 2b).

Modelo LP-3: con unas dimensiones generales de 109 x 69 x 73 cm. Los perfiles son de sección cuadrada 35x35 mm y rectangular 30x40 mm. La base se mantiene con perfiles de 50x50 mm para darle mayor consistencia (Figs. 1c y 2c).

Modelo LP-4: con unas dimensiones generales de 109x69x60 cm. Los perfiles son de sección cuadrada 35x35 mm y rectangular 20x40 mm. La base está formada por perfiles de 60x30 mm y 40x30 mm para reducir la altura y mantener la robustez del conjunto. En este modelo se eliminan los perfiles de la estructura que sostiene las células de carga, situando estas en el fondo de la estructura principal (Figs. 1d y 2d).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se ha indicado en esta comunicación, los prototipos de los lisímetros de pesada han ido modificándose hasta conseguir un diseño final (LP-4) con la menor altura posible, mejorando

en transportabilidad y manteniendo las mismas prestaciones de funcionamiento (Fig. 2). Para conseguir las dimensiones del modelo LP-4, los perfiles laminados utilizados se han ido reduciendo su tamaño, forma y posición, partiendo de perfiles de sección cuadrada de 50x50 mm a perfiles de sección cuadrada 35x35 mm y rectangular 20x40 mm.

El recipiente para evacuación al exterior del agua drenada procedente del recipiente de cultivo ha ido evolucionando en todos los modelos diseñados: en el modelo LP-1 estaba soldado a la base pero se comprobó que era incómodo de manejar en el transporte hasta su ubicación; el LP-2 se dispuso de forma libre pero se comprobó que era difícil de nivelar en el proceso de montaje; en los modelos LP-3 y LP-4 el recipiente está colgado con unas pestañas a la base para facilitar el montaje siendo también mucho más fácil de manejar en el transporte (Fig. 3 izquierda).

En el modelo LP-3 y LP-4 se introdujo en la estructura principal una ventana de inspección para poder visualizar el interior del conjunto y comprobar que todo está en perfecto funcionamiento una vez se ha montado el conjunto (Fig. 3 derecha).

Los modelos LP-1 y LP-2 no tienen incorporado un depósito de toma de muestras, éste se introdujo en los modelos LP-3 y LP-4 ante la necesidad de obtener muestras del agua lixiviada para su posterior análisis en el laboratorio. De igual forma, se instaló en estos dos últimos modelos un filtro de decantación que sirve para reducir el contenido de elementos finos que pudieran pasar a través de la lámina geotextil situada en el fondo del recipiente de cultivo (Fig. 3 centro). El sistema de ventilación del lisímetro también se ha modificado con respecto a los modelos LP-1 y LP-2, posicionando de forma diagonal las salidas favoreciendo así la ventilación cruzada del lisímetro.

4. CONCLUSIONES

En esta comunicación se han presentado cuatro prototipos de lisímetros de pesada para su uso en explotaciones hortícolas, dentro del proyecto de investigación PROLISI. Se han indicado las modificaciones introducidas en los diseños realizados hasta obtener un prototipo de reducidas dimensiones, transportable, fácil de instalar y fiable en sus medidas de la evapotranspiración. En los distintos prototipos se ha reducido la altura total modificando los perfiles empleados, rediseñando los componentes del sistema modular, como el depósito de drenaje y suprimiendo algunos elementos como los soportes del sistema de pesaje. Asimismo se han introducido componentes nuevos, como el recipiente de muestreo del agua lixiviada, el filtro de decantación, la ventana de inspección y la ventilación cruzada del equipo entre otros, que han aumentado las prestaciones del prototipo inicial. Se ha conseguido un prototipo de lisímetro de pesada (LP-4) más portable y de mayor facilidad de montaje que sus antecesores (LP-1, LP-2, LP-3).

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) para la realización de proyectos de investigación. Referencia: AGL2015-66938-C2-1-R. También se agradece la colaboración de la empresa TeleNatura EBT S.L. y a la comunicad de regantes Arco Sur Mar Menor (contrato con la UPCT Ref. 5027/17IAEA “Ayuda a la gestión de los recursos hídricos mediante lisímetros de pesada”).

6. REFERENCIAS

[1] Allen, R. G. 2006. "Evapotranspiración del cultivo: guías para la determinación de los requerimientos de agua de los cultivos," Food & Agriculture Org.

[2] Hirschi, M., Michel, D., Lehner, I., and Seneviratne, S. I. 2017. A site-level comparison of lysimeter and eddy covariance flux measurements of evapotranspiration. *Hydrology and Earth System Sciences* 21, 1809-1825.

[3] Liu, S., Bai, J., Jia, Z., Jia, L., Zhou, H., and Lu, L. 2010. Estimation of evapotranspiration in the Mu Us Sandland of China. *Hydrology and Earth System Sciences* 14, 573-584.

[4] López-Urrea, R., de Santa Olalla, F. M., Fabeiro, C., and Moratalla, A. 2006. Testing evapotranspiration equations using lysimeter observations in a semiarid climate. *Agric. Water Manag.* 85, 15-26.

[5] Zhang, X., Hu, L., Bian, X., Zhao, B., Chai, F., and Sun, X. 2007. The most economical irrigation amount and evapotranspiration of the turfgrasses in Beijing City, China. *Agric. Water Manag.* 89, 98-104.

[6] Zhang, Z.-S., Liu, L.-C., Li, X.-R., Zhang, J.-G., He, M.-Z., and Tan, H.-J. 2008. Evaporation properties of a revegetated area of the Tengger Desert, North China. *J. Arid Environ.* 72, 964-973.

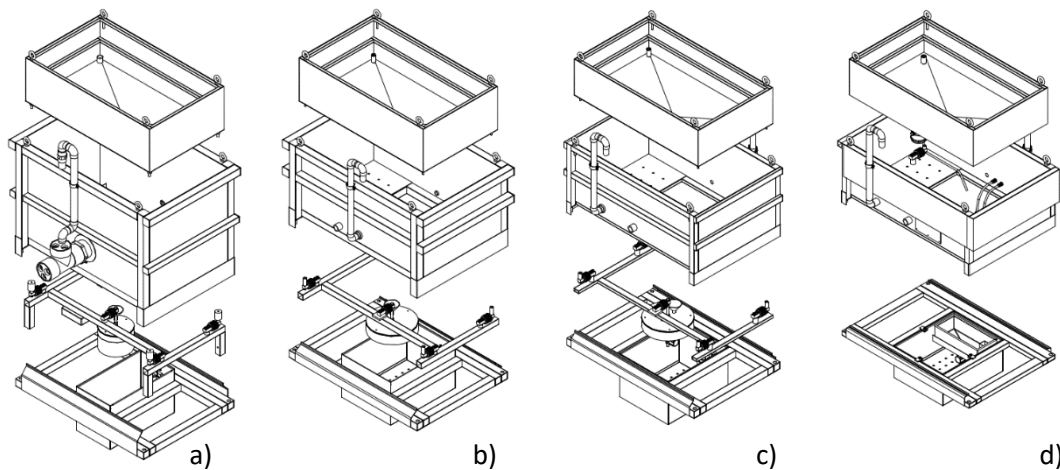


Figura 1. Vistas explosionadas de los cuatro prototipos: a) LP-1, b) LP-2, c) LP-3 y d) LP-4.

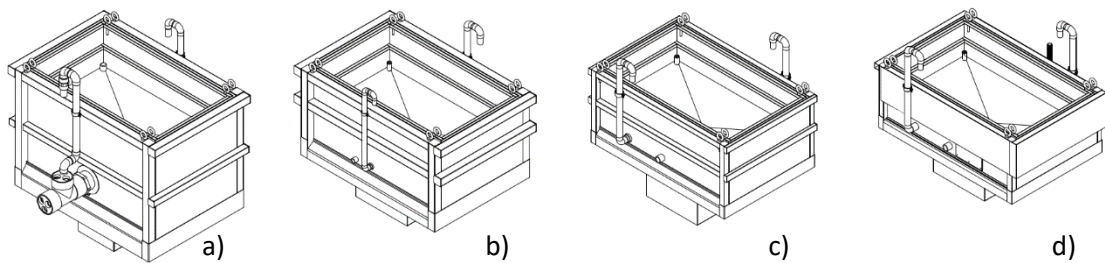
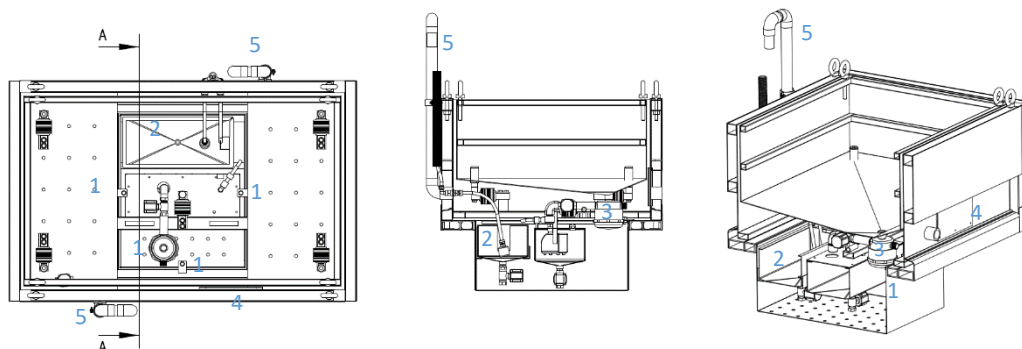


Figura 2. Vistas ensambladas de los cuatro prototipos: a) LP-1, b) LP-2, c) LP-3 y d) LP-4.



Legenda: 1 Pestañas sujeción; 2 Depósito muestreo; 3 Filtro decantación; 4 Ventana inspección; 5 Sistema ventilación cruzada

Figura 3. Vista en planta del modelo LP-4 (izqda.), en sección (centro) y perspectiva (dcha.).

ORAL SESSION IV:
Agrifood Biotechnology

Composition of fatty acids of the rabbit meat in function of the genetic line and the diet

Composición de ácidos grasos de la carne de conejo en función de la línea genética y la dieta

A.M. Martínez-Bas^{1*}, M. Kessler², J.J. Marín³, E. Armero¹

¹ Dept. de Agricultura, Ciencia y Tecnología. Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT), Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Murcia, Spain.

² Dept. de Matemáticas Aplicadas y Estadística. Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT), Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Murcia, Spain.

³ QUIN Sociedad Cooperativa, Ctra. Vereda del Catalán, nº 62, 30162 Santa Cruz, Murcia, Spain.

* anamartinezbas@hotmail.com

Abstract

The effect of two diets with different fiber levels on the composition of the fat profile of the rabbit meat was estimated for a total of 150 animals from three different genetic lines (Ebro - EB and Grimaud - GR, selected by growth rate and Hyla - HY selected by maternal aptitude). The animals were fed a control diet (C) (25% fiber) and another energy (HE) (17% fiber). After slaughter at 8 and 12 weeks of age, the nutritional content of the meat of a hind leg, was analyzed obtaining the percentage of intramuscular fat and the profile of fatty acids. We observed that the intramuscular fat content decreased according to age, as did the omega 6 / omega 3 ratio ($P < 0.05$). The maternal aptitude line (HY) presented significant differences respect to EB and GR in the PUFA content at 12 weeks, with a higher concentration of these fatty acids. With respect to both diets, there is differences in palmitic acid (C16: 0) at 12 weeks with a higher content of animals fed with the HE diet ($28.97\% \pm 0.05$) than foods with C diet ($27.75\% \pm 0.05$). Thus, the fat content can be influenced by the age, by the genetic line, and to a lesser extent by the diet.

Keywords: Fatty acids profile; intramuscular fat; omega 6 / omega 3 ratio.

Resumen

El efecto de dos dietas con diferentes niveles de fibra en la composición del perfil de ácidos grasos de la carne de conejo fue estimado para un total de 150 animales de tres líneas genéticas diferentes (Ebro - EB y Grimaud - GR, seleccionados por velocidad de crecimiento e Hyla - HY seleccionada por aptitud maternal). Los animales fueron alimentados con una dieta control (C) (25% de fibra) y otra más energética (HE) (17% de fibra). Tras el sacrificio a las 8 y a las 12 semanas de edad analizamos el contenido nutricional de la carne de una pata trasera, obteniendo el porcentaje de grasa intramuscular y el perfil de ácidos grasos. Observamos que el contenido de grasa intramuscular descendió conforme avanza la edad, al igual que el ratio omega 6/omega 3 ($P < 0,05$). La línea de aptitud maternal (HY) presentaron diferencias significativas respecto a EB y GR en el contenido de PUFA a las 12 semanas, siendo mayor su concentración de estos ácidos grasos. Respecto a las dos dietas, hay diferencias en el ácido palmítico (C16:0) a las 12 semanas teniendo un contenido superior los animales alimentados con la dieta HE ($28,97\% \pm 0,05$) que los alimentados con la dieta C ($27,75\% \pm 0,05$). Así, el contenido en ácidos grasos puede ir influenciado por la edad, por la línea genética, y en menor medida por la dieta.

Palabras clave: Perfil ácidos grasos; grasa intramuscular; ratio omega 6 / omega 3.

1. INTRODUCCIÓN

La carne de conejo es muy apreciada por su composición nutricional y sus propiedades dietéticas. Es recomendada en dietas bajas en colesterol, ya que previene enfermedades o trastornos cardiovasculares. Según McCance and Widdowson's. (2002) [1] que compararon los principales ácidos grasos contenidos en distintos tipos de carne, la carne de conejo es más rica en ácido linoleico (C18:2n6) que otras carnes como vacuno, ovino, cerdo y pollo.

Nuestro objetivo es definir y comparar el perfil de ácidos grasos a las 8 y 12 semanas de edad de conejos de tres líneas genéticas diferentes (Grimaud y Ebro, seleccionadas por velocidad de crecimiento e Hyla seleccionada por prolificidad) alimentadas por dos dietas, una control y una dieta más energética.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

De los 2294 animales procedentes del cruzamiento de la hembra Hyla con machos terminales de tres líneas genéticas (Grimaud = GR, Ebro = EB e Hyla = HY) se analizó la composición química de 660 muestras del músculo de la misma, obteniendo entre otros parámetros el porcentaje de grasa intramuscular (ISO 1443). También se analizó el perfil de ácidos grasos de 150 muestras, 25 muestras por cada línea genética, dieta (Control = C y Altamente energética = HE) y edad de sacrificio (8 semanas y 12 semanas). El protocolo de extracción de ácidos grasos fue el seguido por O'Fallon et al. (2007) [2] que consiste en un método directo para la síntesis de ésteres metílicos de ácidos grasos a partir de tejidos cárnicos.

Los resultados fueron analizados con el procedimiento GLM [3]. Los diferentes ácidos grasos fueron analizados con el modelo que incluía la línea genética y el tipo dieta como efectos fijos, ya que era el modelo que presentaba el menor valor de AIC. Las interacciones no fueron significativas. A partir de este modelo se obtuvieron las medias mínimo cuadráticas que fueron comparadas mediante un test t-student, considerando que eran diferentes para un nivel de significación $P < 0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto de la línea genética en el perfil de ácidos grasos para la semana 8 (Tabla 1) muestra que Grimaud (GR) es diferente a Hyla (HY) y Ebro (EB) en el contenido de ácidos grasos insaturados, mientras que a la semana 12 (Tabla 2) los resultados varían, siendo la línea de aptitud maternal (HY) diferente significativamente a las dos líneas mejoradas por velocidad de crecimiento (EB y GR).

De acuerdo con nuestros resultados, el contenido en omega 6 (n-6) es mayor a las 8 semanas que a las 12 semanas porque existe una relación directa con el periodo de lactancia. Así conejos con edades próximas al destete tienen mayor contenido de n-6 debido a que la composición de la dieta de las madres durante el periodo de lactancia es rica en cereales con alto contenido en ácidos omega 6. Consecuentemente, el ratio n6-n3 desciende significativamente con la edad de acuerdo con nuestros resultados. Según Combes (2004) [4] el descenso del contenido en n-6 es relativamente estable en la carne de conejo (c.v.=15%), mientras que el contenido en n-3 es susceptible de grandes variaciones (c.v.=45%).

Respecto al ratio n6/n3 tanto en la semana 8 (Tabla 1) como en la semana 12 (Tabla 2), no encontramos diferencias significativas al ingerir una dieta u otra, a diferencia de Enser et al. (1998) [5] que encontraron una elevada influencia en este ratio según la dieta en toros alimentados con dietas con diferentes niveles de fibra (15,6 vs 2,0).

En conclusión el contenido de grasa intramuscular incrementa durante la fase de engorde. El efecto de la línea genética se ve más pronunciado a mayor edad del conejo tanto en SFA, MUFA como PUFA.

El ratio omega 6/omega 3 desciende considerablemente conforme avanza el estado de madurez. Y no hay efecto de la línea genética, la dieta o la edad en el porcentaje de ácido oleico (C18:1n9) que conlleva niveles bajos de colesterol e incidencia reducida de las enfermedades cardiovasculares.

4. CONCLUSIONES

El contenido de grasa intramuscular incrementa durante la fase de engorde. En relación a al perfil de ácidos grasos de la grasa de la carne de la pata no hay efecto de la línea genética, la dieta o la edad en los SFA mientras que en los MUFA y PUFA hay efecto de la línea genética en las semanas estudiadas. El ratio omega 6/omega 3 desciende considerablemente conforme avanza el estado de madurez excepto en Grimaud.

5. AGRADECIMIENTOS

La realización del presente trabajo ha sido posible gracias al apoyo económico del proyecto CDTI (IDI-20120024) y al apoyo técnico de la empresa QUIN s.l.

6. REFERENCIAS

- [1] McCance and Widdowson's. 2002. The Composition of Foods, Sixth summary edition. Food Standards Agency. Cambridge: R. Soc. Chem. ISBN 0-85404-428-0.
- [2] O'Fallon J.V., Busboom J.R., Nelson M.L., Gaskins C.T. 2007. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils and feedstuffs. *J. Anim Feed Sci.* 85: 1511-1521.
- [3] R Core Team. 2016. R: A language and environment for statistical computing. R 400 Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL. <https://www.R401 project.org/>.
- [4] Combes S. 2004. Valeur nutritionnelle de la viande de lapin. *Inra Productions Animales*, 17(5): 373-383.
- [5] Enser M., Hallet K.G., Hewett B., Fursey G.A.J., Wood J.D., Harrington G. 1998. Fatty acid content and composition of UK beef and lamb muscle in relation to production system and implications for human nutrition. *Meat Science*, 49: 329-341.

Tabla 1. Ratios y sumatorios globales de la composición de ácidos grasos (%) en la grasa intramuscular en la carne de la pata según la línea genética y la dieta a las 8 semanas. (Media mínimo cuadrática (LSM) y errores estándar (SE))

8 semanas										
Ácido graso	EB		GR		HY		C		HE	
	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE
∑ SATURADO	42,118a	0,775	44,054a	0,768	40,739a	0,656	42,933y	0,925	42,497y	0,900
∑ INSATURADO	55,357a	0,890	53,065b	0,789	56,560a	0,854	55,342y	2,876	54,595y	2,821
∑ P:S	0,686a	1,947	0,596a	2,518	0,728a	2,294	0,696y	2,018	0,778y	0,340
∑ OMEGA 6	27,221a	0,650	24,532a	0,661	27,929a	0,432	229,944y	1,178	26,176y	1,158
∑ OMEGA 3	1,672a	0,084	1,7272a	0,090	1,737a	0,005	1,795y	0,696	1,610y	0,562
∑ n6/n3	16,280a	3,210	14,205a	2,210	16,079a	1,250	15,011y	1,693	16,28y	2,060
% grasa intram	3,301a	0,838	3,172a	0,851	3,423a	0,835	3,243y	0,833	3,354y	0,851

Línea genética: EB - Ebro, GR - Grimaud, HY - Hyla. Dieta: HE - High energy diet, C - Control diet. a, b, c = diferentes letras dentro de la fila representan diferencias entre líneas genéticas. y, z = diferentes letras dentro de la fila representan diferencias entre dietas.

Tabla 2. Ratios y sumatorios globales de la composición de ácidos grasos (%) en la grasa intramuscular en la carne de la pata según la línea genética y la dieta a las 12 semanas. (Media mínimo cuadrática ± error estándar).

12 semanas										
Ácido graso	EB		GR		HY		C		HE	
	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE
∑ SATURADO	43,955a	1,175	45,255a	0,806	40,807a	0,838	42,705y	1,296	44,971y	1,342
∑ INSATURADO	51,077a	0,980	52,368a	0,789	56,734b	0,854	53,979y	2,234	52,799y	4,779
∑ P:S	0,960a	0,384	0,864a	0,257	0,719a	0,647	0,791y	0,299	0,851y	0,281
∑ OMEGA 6	19,434a	0,500	20,970a	1,292	23,618a	0,341	22,938y	1,690	19,737y	1,620
∑ OMEGA 3	2,127a	0,791	0,977a	0,782	2,082a	0,087	1,695y	0,453	1,762y	0,550
∑ n6/n3	9,137a	0,632	21,464a	1,652	11,344ab	3,920	13,533y	3,731	11,202y	2,946
% grasa intram	4,040a	0,488	4,195a	0,871	3,844a	0,470	3,907y	0,468	4,145y	0,485

Línea genética: EB - Ebro, GR - Grimaud, HY - Hyla. Dieta: HE - High energy diet, C - Control diet. a, b, c = diferentes letras dentro de la fila representan diferencias entre líneas genéticas. y, z = diferentes letras dentro de la fila representan diferencias entre dietas.

Understanding genetic mechanisms underpinning volatile emission

Entendiendo los mecanismos genéticos que sustentan las emisiones de volátiles

V. Ruiz-Hernández, J. Weiss, M. Egea-Cortines

Genética Molecular, Edificio I+D+i, Plaza del Hospital s/n, Universidad Politécnica de Cartagena, 30202 Cartagena.

* victoria.ruiz@upct.es

Abstract

From a cross performed between *A. majus* and *A. linkianum*, we obtained a F2 segregating population of 110 plants. We analyzed the scent emission of this population. We focused on four of the main volatiles present in the population: acetophenone, methyl benzoate, methyl cinnamate and β -ocimene. We analysed the possible mendelian segregations of these volatiles within the population, finding that all of these volatiles might be result of the segregation of one or two genes. Despite of being products of very complex metabolic pathways, the emission of these volatiles is result of simple or epistatic interactions. This basic approach is a useful tool for further molecular studies.

Keywords: Mendelian; RIL; gene.

Resumen

A partir de un cruce realizado entre *A. majus* y *A. linkianum*, obtuvimos una población F2 segregante de 110 plantas. Analizamos la emisión de aromas en esta población. Nos centramos en cuatro de los principales volátiles presentes en la población: acetofenona, metil benzoato, metil cinamato y ocimeno. Analizamos las posibles segregaciones mendelianas de estos volátiles en la población, encontrando que todos ellos pueden ser el resultado de la segregación de uno o dos genes. A pesar de ser el producto de rutas metabólicas muy complejas, la emisión de estos volátiles es el resultado de interacciones simples o epistáticas. Este enfoque básico es una herramienta útil para futuros estudios moleculares.

Palabras clave: Mendeliano; RIL; gen.

1. INTRODUCTION

Floral scent is one of the most important traits involved in pollination, yet it is a very complex trait due to the great amount of compounds found in plants [1]. Populations of Recombinant Inbred Lines (RILs) can be used for studying the genetic structure of complex traits [2]. Changes on the scent profiles can lead to major ecological changes, including speciation [3].

The aim of this study is to assess the possible mendelian segregations explaining the emission of acetophenone, methyl benzoate, methyl cinnamate and β -ocimene on a RILs (F2) population from a cross between *A. majus* and *A. linkianum*.

2. MATERIALS AND METHODS

The headspace volatile analysis was performed and quantified according to Ruiz-Hernández et al. (2017) [2]. Where flowers were isolated into desiccators and volatile compounds were adsorbed by magnetic stir bars (Twisters™) during 24 hours.

The statistical analysis of the segregation models have been done by using χ^2 test (chi-squared). P-values under 0.05 rejected the null hypothesis.

3. RESULTS Y DISCUSSION

A. majus and *A. linkianum* are known for having contrasting scent profiles [2, 3] regarding the volatiles aim of study on this work. Whereas *A. majus* is a high producer of methyl benzoate and acetophenone, *A. linkianum* is a low producer of these compounds. On the other hand, *A. linkianum* is a high producer of methyl β -ocimene and a relatively high producer of β -ocimene, however *A. majus* produces relatively much less quantities or any emission at all of these compounds [3]. Because of this disparity in volatiles emission, these two species are a perfect model system for studying the genetic reasons underlying the emission of these important volatiles.

From the 110 different plants analysed we found that they could be grouped as high or low-absent emitters of acetophenone, methyl benzoate, methyl cinnamate and β -ocimene. The different groups are represented in Fig. 1. We performed several statistical analysis based on the different groups established on Fig1, to determine which mendelian segregations suit the data (Table 1).

To represent the emission of acetophenone, methyl benzoate, methyl cinnamate and β - β -ocimene we elaborated Fig. 2 where we display the mendelian segregations that based on the bibliography would probably be one of the most suitable to explain the emission of these compounds on the population.

In the case of methyl benzoate, it is known that the major enzyme responsible its emission in *Antirrhinum* is benzoic acid carboxymethyltransferase (BAMT) [4–6]. Our group has recently published the *A. linkianum* BAMT locus and unearthed that major rearrangements on the promoter region are responsible of the lack of emission of methyl benzoate in *A. linkianum* [2]. These evidences support the mendelian segregation found for methyl benzoate in the *A. majus* x *A. linkianum* F2 segregation, where 3:1 segregation explains its emission with a p-value of 0.582.

β -ocimene synthase is the known enzyme responsible of the synthesis of β -ocimene in *A. majus*, being coded by the gene *ama0a23* [7]. We found two suitable mendelian segregations for the emission of β -ocimene in the population (3:1 and 13:3), meaning that its emission could be explained by the simple segregation of a gene or an epistatic segregation of two genes. It is yet to be established if β -ocimene synthase is the only enzyme synthesizing β -ocimene on *A. majus*.

These results also validate to some extent the mendelian segregation approach proposed in this work. Due to the lack of light over the genes implied on the emission of methyl cinnamate and acetophenone, this work is a guide for future research on the genetic basis of their emission. As our results indicate, acetophenone could be explained by the epistatic segregation of two genes, whereas methyl cinnamate emission is expected to be result of the segregation of a single gene where the dominant allele is non-functional.

4. CONCLUSIONS

Our results indicate that the usage of F2 populations to guide genetic molecular work are still a useful tool. Due to the lack of knowledge regarding acetophenone and methyl cinnamate

emission, our results have provided a helpful guide in our attempts to clone the genes underlying these compounds.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the founding provided to Victoria Ruiz-Hernández by the Spanish Ministerio de Educación Cultura y Deporte (FPU13/03606) and also by the Ministerio de Ciencia e Innovación-Fondo de Desarrollo Regional (BFU2013-45148-R). As well as to M^a José Roca from the Servicio de Apoyo a la Investigación Tecnológica for her technical support.

6. REFERENCES

- [1] Knudsen J.T., Eriksson R., Gershenzon J., Ståhl B., Stahl B. 2006. Diversity and distribution of floral scent. *Bot Rev.* 72:1–120.
- [2] Ruiz-Hernández V., Hermans B., Weiss J., Egea-Cortines M. 2017. Genetic Analysis of Natural Variation in *Antirrhinum* Scent Profiles Identifies BENZOIC ACID CARBOXYMETHYL TRANSFERASE As the Major Locus Controlling Methyl Benzoate Synthesis. *Front Plant Sci.* 8:27.
- [3] Weiss J., Mühlemann J.K., Ruiz-Hernández V., Dudareva N., Egea-Cortines M. 2016. Phenotypic space and variation of floral scent profiles during late flower development in *Antirrhinum*. *Front Plant Sci.* 7:1903.
- [4] Murfitt L.M., Kolosova N., Mann C.J., Dudareva N. 2000. Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine: Benzoic acid carboxyl methyltransferase, the enzyme responsible for biosynthesis of the volatile ester methyl benzoate in flowers of *Antirrhinum majus*. *Arch Biochem Biophys.* 382:145–151.
- [5] Dudareva N., Murfitt L.M., Mann C.J., Gorenstein N., Kolosova N., Kish C.M., Bonham C., Wood K. 2000. Developmental regulation of methyl benzoate biosynthesis and emission in snapdragon flowers. *Plant Cell.* 12:949–961.
- [6] Effmert U., Saschenbrecker S., Ross J., Negre F., Fraser C.M., Noel J.P., Dudareva N., Piechulla B. 2005. Floral benzenoid carboxyl methyltransferases: from in vitro to in planta function. *Phytochemistry.* 66:1211–30.
- [7] Dudareva N., Martin D., Kish C.M., Kolosova N., Gorenstein N., Faldt J., Miller B., Bohlmann J. 2003. (E)-beta-ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: Function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily. *Plant Cell.* 15:1227–1241.

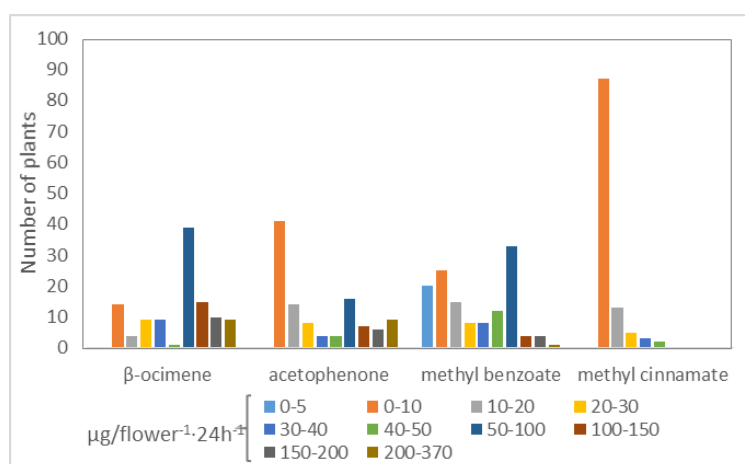


Figure 1. Number of plants emitting different ranges of quantities of volatiles

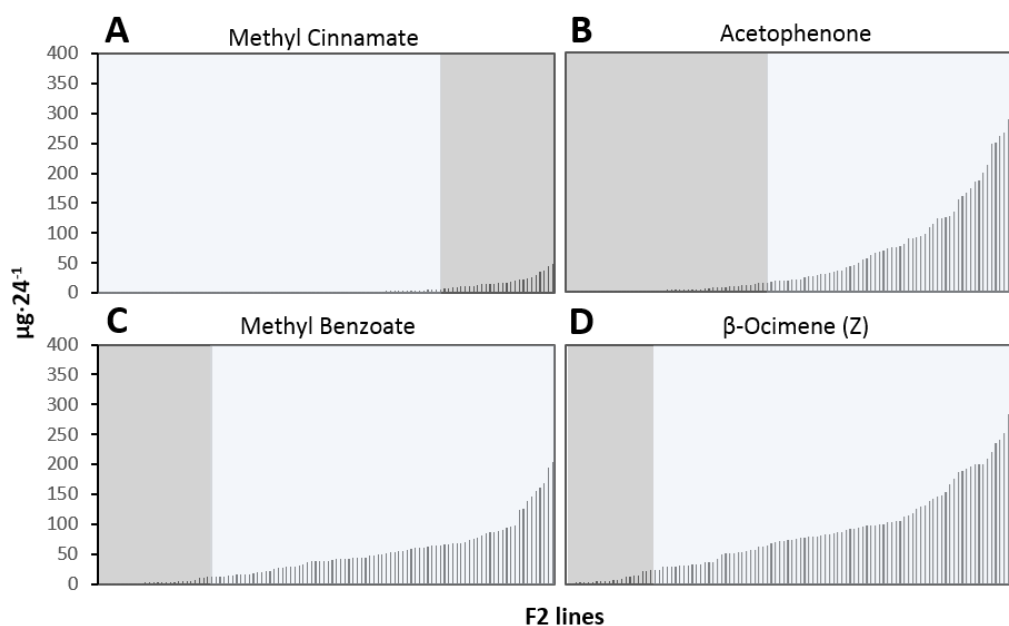


Figure 2. Individual emission of the interest volatiles by the 110 F2 lines of the population. Dark shaded areas indicate the proportion of lines considered as recessive. Light shaded areas indicate the dominant proportion of segregations: methyl cinnamate (3:1), acetophenone (9:7), methyl benzoate (3:1) and β -ocimene (13:1). See table 1.

Table 1. Possible segregations for the volatiles of interest

Compound	Segregation model	χ^2 (p-value)
Methyl benzoate	3:1 (85:25)	0.582*
β-Ocimene	3:1 (96:14)	0.002953
	3:1 (92:18)	0.03645
	3:1 (83: 27)	0.9123*
	13:3 (96:14)	0.1056*
Methyl cinnamate	3:1 (87:23)	0.3218*
Acetophenone	3:1 (68:41)	0.002354
	1:2:1 (41:46:22)	0.0001789
	9:7 (68:41)	0.1966*

Agronomic evaluation of Levante 20[®], Levante 40[®] y Levante 45[®], varieties of the peach breeding program (*Prunus persica* L.): IMIDA-NOVAMED.

Evaluación agronómica de Levante 20[®], Levante 40[®] y Levante 45[®], variedades del programa de mejora genética de melocotonero (*Prunus persica* L.): IMIDA-NOVAMED.

A. Guevara^{*}, A. Carrillo, F. García, D. López, M.B. Lopez, J. Cos

Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA)

Calle Mayor S/N, 30.150, La Alberca (MURCIA).

*alfonso.guevara@carm.es

Abstract

The non-melting yellow peach or “pavia” has decreased its production in recent years, but at the national level it still has an internal market gap for fresh consumption. The breeding program IMIDA-NOVAMED has developed three varieties of this typology: Levante 20[®], Levante 40[®] y Levante 45[®] with very similar characteristics and good organoleptic qualities, differing in ripening dates and percentage of over-coloring with the reference varieties of yellow peach in the market. Being able to offer a series of yellow peaches or similar peaches in a continuous way in the sale lines, and thus the consumer can enjoy the same type of peach for a long period.

Keywords: Pavia; acidity; organoleptic quality; FDP.

Resumen

El melocotón amarillo de carne dura o pavía ha disminuido su producción en los últimos años, pero a nivel nacional sigue teniendo un hueco de mercado interior para su consumo en fresco. El programa de mejora IMIDA-NOVAMED ha desarrollado tres variedades de esta tipología: Levante 20[®], Levante 40[®] y Levante 45[®] con unas características muy similares y buenas calidades organolépticas, diferenciándose en fechas de maduración y porcentaje de sobrecoloración con las variedades de referencia de melocotón amarillo en el mercado. Pudiendo ofrecer así una serie de melocotones amarillos o pavías similares de forma continua en los lineales de venta, y así el consumidor poder disfrutar durante un largo periodo de tiempo el mismo tipo de melocotón.

Palabras clave: Pavía; acidez; calidad organoléptica; FDP.

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial España ya se posiciona como el segundo país productor, y primer país exportador de melocotón [1] gracias a su amplia gama de variedades que abarcan un largo periodo de recolección y comercialización.

Hasta hace unos años España carecía de programas de mejora genética, dependiendo de las variedades de programas de mejora foráneos, con la problemática de tener un difícil acceso a las nuevas variedades, la falta de adaptación de muchas de estas a la zona de cultivo, y el alto pago de

royalties expuesto por los obtentores. De ahí que a día de hoy existan en España 12 programas de mejora genética tanto públicos, privados como público-privados [2], entre ellos se encuentra el programa de mejora genética público-privado IMIDA-NOVAMED. Este programa tiene como objetivos básicamente la obtención de variedades que se adapten a las condiciones edafoclimáticas de la Región de Murcia, maduración precoz con una alta productividad y una buena calidad organoléptica, respecto a todas las tipologías de melocotón [3].

Los objetivos de este trabajo son el estudio agronómico, caracterización en campo, análisis de laboratorio y estudio de las necesidades de frío, de las variedades del programa de mejora genética IMIDA-NOVAMED para poner al alcance de los productores las variedades: Levante 20®, Levante 40® y Levante 45®.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Parcela experimental.

Las variedades estudiadas se encuentran ubicadas en la finca de Novamed en la Hoya del Campo, Abarán (Murcia) que cuenta con una superficie de 8 hectáreas y una media de 500 horas frío < 7 °C. Las variedades están en la misma parcela que la colección de variedades comerciales en un marco de plantación de 4x4m sobre patrón Garnem (*GxN 15*), la finca cuenta con estación meteorológica perteneciente a la red de estaciones del SIAM y un sistema de fertirrigación para el correcto abonado a través del riego localizado de cada parcela.

2.2 Caracterización en campo.

Para el control de la floración se definió el comienzo, como aquel estado vegetativo en que los árboles presentaron un 5% de flores completamente abiertas, plena floración al 50% y final de floración al 90% con caída de pétalos. Para el control de la recolección se anotaron las fechas de maduración y si existía tendencia del fruto a caer antes de la recolección. Del fruto se tomaron los primeros datos como tipología, color de epidermis y pulpa, cata, etc. También se realizó la evaluación de los ramos mixtos, flores, hojas y hueso en su momento de evaluación.

2.3 Caracterización en laboratorio.

Se caracterizaron 25 frutos por variedad, teniendo en cuenta sobrecoloración o chapa del fruto, diámetro ecuatorial y longitudinal de los frutos mediante el calibre electrónico MITUTUYO, para caracterizar la pulpa de las variedades estudiadas se determinó la firmeza de la carne mediante un penetrómetro digital PENEFEL, usando un vástago cilíndrico de 8 mm de diámetro, expresando los datos en kg/cm². Para la determinación del contenido en sólidos solubles (°Brix) y acidez se preparó una muestra de zumo de los 25 frutos. La medida de °Brix se realizó con el refractómetro digital Atago, realizando tres repeticiones de cada una de las muestras. La acidez se determinó con el valorador automático Metrohm, a partir de una muestra de 10 ml de zumo valorado con NaOH 0,1 N.

2.4 Estudio de las necesidades de frío y calor.

Para cuantificar la adaptación de las variedades a una determinada zona de cultivo se calcularon las necesidades de frío de cada variedad siguiendo la metodología descrita por el equipo de mejora genética de *Prunus* del CEBAS-CSIC [4], usando los siguientes modelos: horas bajo 7 °C (HF) [5], unidades de frío (UF) según el modelo de Utah [6] y modelo dinámico o de porciones [7].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El resultado del trabajo ha sido el desarrollo de una serie de melocotones amarillos, de carne dura con la misma tipología y características similares, para poder suministrar de forma continua a los lineales de venta.

Levante 20® se caracteriza por ser un melocotón amarillo de carne dura, con una floración entre la 3ª y 4ª semana de febrero, la recolección viene dada entre la 1ª y 2ª semana de junio (Tabla 2). Lo hace característico por no tener nada de sobrecoloración, es totalmente amarillo muy llamativo, presenta un alto contenido de azúcar y una acidez baja (Tabla 3), tiene unas necesidades de frío medias de 32,4 porciones (Tabla 1). Se recolecta 15 días antes que Romea y 25 días que Catherina, variedades de referencia a lo largo de los años en esta tipología de melocotón amarillo (Fig. 1).

Levante 40® es un melocotón amarillo de carne dura con una floración entre la 3ª y 4ª semana de febrero, la recolección viene dada entre la 1ª y 2ª semana de junio (Tabla 2). Se caracteriza por tener sobrecoloración, haciéndolo atractivo a la vista en los stands de los lineales de venta, tiene un alto contenido en azúcar y una acidez media que le atribuye un sabor equilibrado y aroma muy apetecible en boca (Tabla 3). Sus necesidades de frío medias son de 34 porciones (Tabla 1). Se recolecta 14 días antes que Romea y 25 días que Catherina (Fig. 1).

Levante 45® se caracteriza por ser un melocotón amarillo de carne dura con una floración entre la 3ª y 4ª semana de febrero, la recolección viene dada entre la 2ª y 3ª semana de junio (Tabla 2). Presenta una sobrecoloración baja, destaca su gran tamaño y calibre, presenta un alto contenido en azúcar y baja acidez, que le atribuye grandes cualidades organolépticas (Tabla 3). Sus necesidades de frío medias son de 30,6 porciones (Tabla 1). Se recolecta 12 días antes que Romea y 23 días antes que Catherina (Fig. 1), superando a ambos en calibre y tamaño.

4. CONCLUSIONES

Las tres variedades destacan por su fecha de maduración anticipada dentro de la tipología de melocotón amarillo respecto a las variedades de referencia de melocotón amarillo de carne dura.

De las tres variedades, levante 20® y levante 40® se solapan en fecha de recolección, diferenciándose dentro de la tipología de melocotón amarillo, el primero por no tener sobrecoloración ninguna y el segundo por tener un pequeño porcentaje de sobrecoloración.

Levante 45® es la que mayor calibre y sobrecoloración presenta de las 3 variedades, comenzando su recolección, en el momento de la plena recolección de las otras dos variedades.

La caracterización de estas selecciones dio lugar a la solicitud de obtención vegetal en el registro, las cuales ya están siendo usadas por productores en plantaciones comerciales.

6. REFERENCIAS

- [1] FAOSTAT. 2018. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Data Crops.
- [2] Iglesias, I., Reig, G., Carbó, J., and Bonany, J. 2012. Innovación varietal en melocotón rojo de carne amarilla. *Vida Rural* 339: 18-24.
- [3] Guevara Gázquez, A., García Montiel, F., Carrillo Navarro, A., López Ortiz, D., López Soto, M.B., and Cos Terrer, J.E. 2016. Mejora genética de frutales de hueso en el Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario. *Horticultura. Interempresasmedia HC326*: 36-40.
- [4] Ruiz, D., Campoy, J.A., and Egea, J. 2007. Chilling and heat requirements of apricot cultivars for flowering. *Environmental and Experimental Botany* 61(3): 254-263. doi: 10.1016/j.envexpbot.2007.06.008.

[5] Weinberger, J.H. 1950. CHILLING REQUIREMENTS OF PEACH VARIETIES. Proceedings of the American Society for Horticultural Science 56(DEC): 122-128.

[6] Richardson, E., Seeley, S., and DR., W. 1974. A model for estimating the completion of rest for "Redhaven" and "Elberta" peach trees. Hortscience: 331-332.

[7] Fishman, S., Erez, A., and Couvillon, G.A. 1987. THE TEMPERATURE-DEPENDENCE OF DORMANCY BREAKING IN PLANTS - COMPUTER-SIMULATION OF PROCESSES STUDIED UNDER CONTROLLED TEMPERATURES. J. Theor. Biol. 126(3): 309-321. doi: 10.1016/s0022-5193(87)80237-0.

Tabla 1. Datos promedio de las necesidades de frío y calor de las variedades IMIDA-NOVAMED: Levante 20[®], Levante 40[®] y Levante 45[®].

Variedad		HF <7°C	Unidades Richardson	Porciones	GDH Richardson
Levante 20 [®]	Promedio	319±78,4	565,3±52,9	35,1±2,1	4.592±148
Levante 40 [®]	Promedio	293,7±58,2	517,3±66,6	30,5±4,3	8.017±290,5
Levante 45 [®]	Promedio	228±23,9	463±73,2	30,6±3,5	7.864±182

Tabla 2. Fechas de recolección, floración y periodo de desarrollo del fruto de las variedades IMIDA-NOVAMED: Levante 20[®], Levante 40[®] y Levante 45[®].

Variedad	Año	Inicio recolección	Plena recolección	Final recolección	FDP	Inicio floración	Plena floración	Final floración
Levante 20 [®]	2017	05-jun-17	08-jun-17	13-jun-17	100	17-feb-17	21-feb-17	25-feb-17
Levante 40 [®]	2017	06-jun-17	10-jun-17	14-jun-17	99	18-feb-17	24-feb-17	27-feb-17
Levante 45 [®]	2017	08-jun-17	13-jun-17	17-jun-17	101	15-feb-17	21-feb-17	27-feb-17

Tabla 3. Datos promedio de 5 años de las variedades del programa de mejora IMIDA-NOVAMED: Levante 20[®], Levante 40[®] y Levante 45[®].

Variedad	% rojo	Dureza (Kg/cm ²)	Peso (gr)	Calibre (mm) ecuatorial	Calibre (mm) longitudinal	Azúcar (°Brix)	Acidez (g. ac. Mal./l)
Levante 20 [®]	0	2,1±0,3	194,6±36,4	71,6±6	65,1±4,5	13,0±1,2	5,2±0,6
Levante 40 [®]	11,5±4,8	2,5±0,2	221,9±21,7	74,9±2,6	68,0±3,5	13,3±0,7	6,0±1,2
Levante 45 [®]	14,9±3,5	2,1±0,1	294,4±49,4	82,5±5,1	75,1±5,8	13,2±0,8	5,6±0,4

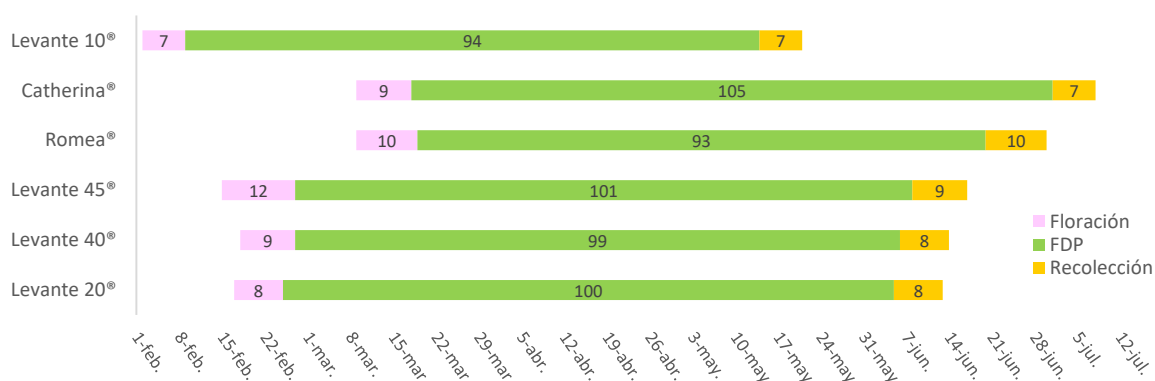


Figura 1. Periodo de floración, FDP y recolección en 2017 en la Hoya del Campo (Abarán).



Figura 2. Fotografía detalle de las variedades a estudio de IMIDA-NOVAMED.

Second generation of viral vectors based on pepino mosaic virus

Segunda generación de vectores virales basados en el virus del mosaico del pepino dulce

F. Ruiz-Ramón*, N.R. Sempere, F.E. Méndez-López, M.A. Sánchez-Pina, M.A. Aranda

Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), Departamento de Biología del Estrés y Patología Vegetal, PO Box 164, 30100 Espinardo, Murcia, Spain.

*frui@cebas.csic.es

Abstract

Our group has already developed an efficient *Pepino mosaic virus* (PepMV; genus *Potexvirus*)-based vector (pBPepGFP2a) for protein expression and virus induced gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. The aim of this work was to further improve pBPepGFP2a in terms of stability and suitability for reporting infections in tomato. To avoid homologous recombination due to sequence duplication, two new constructs with different number of mutations were designed, pBPepGFPm1 and pBPepGFPm2, using pBPepGFP2a as backbone. Stability assays showed that PepGFPm2 was stable in *N. benthamiana* plants for at least 3 passages, but not in tomato plants, in which no GFP expression was detected with any of the vectors. Then, the *gfp* gene from pBPepGFPm2 was replaced by the *DsRed* or *mCherry* genes, giving rise to the PepDsRed and PepmCherry vectors. Both vectors were stable in *N. benthamiana* and PepDsRed was also stable in tomato at least during two passages.

Keywords: GFP; dSRed; mCherry; tomato.

Resumen

Nuestro grupo ya ha desarrollado un vector eficiente (pBPepGFP2a) basado en el Virus del mosaico de pepino dulce (PepMV; género *Potexvirus*) para la expresión de proteínas y el silenciamiento génico inducido por virus en *Nicotiana benthamiana*. El objetivo de este trabajo fue mejorar aún más pBPepGFP2a en términos de idoneidad y estabilidad en infecciones en tomate. Para evitar la recombinación homóloga debido a la duplicación de la secuencia, se diseñaron dos construcciones nuevas con diferente número de mutaciones, pBPepGFPm1 y pBPepGFPm2, utilizando pBPepGFP2a como molde. Los ensayos de estabilidad mostraron que PepGFPm2 era estable en plantas de *N. benthamiana* durante al menos 3 pases, pero no en plantas de tomate, en las que no se detectó expresión de GFP con ninguno de los vectores. Posteriormente, el gen *gfp* de pBPepGFPm2 fue reemplazado por los genes *DsRed* o *mCherry*, dando lugar a los vectores PepDsRed y PepmCherry. Ambos vectores fueron estables en *N. benthamiana* y PepDsRed fue también estable en tomate al menos durante dos pases.

Palabras clave: GFP; dSRed; mCherry; tomate.

1. INTRODUCCIÓN

El Virus del mosaico de pepino dulce (PepMV) causa unas importantes pérdidas económicas en cultivos de tomate a nivel mundial. PepMV pertenece al género *Potexvirus* (familia *Flexiviridae*).

El genoma de PepMV está formado por una molécula de ARN monocatenario de aproximadamente 6,4 kb de longitud, que comprende cinco marcos de lectura abiertos (ORF) flanqueados por regiones 5' y 3' no codificantes. Los ORF codifican una ARN polimerasa de 164 kDa (RdRp); tres proteínas del bloque de tres genes (TGB) llamadas TGB1 (26 kDa), TGB2 (14 kDa) y TGB3 (9 kDa); y la proteína de cápsida (CP) de 25 kDa [1]. PepMV es un buen candidato como vector de expresión en plantas debido a su alto nivel de acumulación y la ausencia de síntomas de infección severa para algunos aislados, factores que ya han llevado al desarrollo de otros vectores de potexvirus [2]. Los virus de plantas son vectores de expresión útiles porque pueden provocar infecciones sistémicas que permiten que se produzcan rápidamente grandes cantidades de proteína recombinante en tejidos vegetales diferenciados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Construcciones de DNA y vectores de PepMV

Todos los mutantes y vectores de PepMV se construyeron mediante PCR solapantes y posteriormente métodos de clonación molecular. Para pBPepGFPm2 se empleó el método de clonación Gateway, clonando ambas construcciones en el vector pBIN61, mientras que para pJL89PepDsRed y pJL89PepmCherry se empleó el método Gibson Assembly, clonando ambas construcciones en el vector pJL89. En ambos casos se procedió según el protocolo suministrado en el kit.

2.2 Visualización de la fluorescencia e inoculación

Se transformó *Agrobacterium tumefaciens* (cepa C58C1) con las diferentes construcciones de PepMV mediante electroporación. Las agroinfiltraciones de *N. benthamiana* se realizaron con jeringa con una mezcla del cultivo y el supresor de silenciamiento p19 en una proporción 1:3. La inoculación mecánica en tomate (cv. M82) y *N. benthamiana* se llevó a cabo homogeneizando el tejido de la hoja sistémica infectada en fosfato de sodio 30 mM, pH 8,0. Las plantas de *N. benthamiana* y tomate se cultivaron en una cámara de crecimiento (fotoperíodo de 16 h, 25°C). La fluorescencia se observó bajo luz UV (365 nm) proporcionada por una lámpara de mano (lámpara Blak Ray B100-AP, Upland, CA 91786, EE. UU.).

2.3 Extracciones de RNA y RT-PCR

El ARN total se extrajo usando Tri-reagent (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). La transcripción inversa se realizó con el kit One-Step RT-PCR (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µl, contenían 250ng de ARN y 0,6µM de cada par de cebadores. Después de 25 y 30 ciclos, los fragmentos generados por PCR se analizaron en geles de agarosa al 1%.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Mejora de un vector basado en PepMV para la expresión estable de GFP

En trabajos previos del grupo se ha descrito la obtención y análisis de un vector basado en PepMV que expresa el gen *gfp* (PepGFP2a), estable en *N. benthamiana* [3] pero no en plantas de tomate (datos no mostrados). En este vector viral se fusionó a la CP del virus el gen *gfp* a través del péptido autocatalítico 2A del Food-and-mouth disease virus. Para mantener intacta la secuencia codificante de la CP fue necesario introducir una duplicación, dado que el promotor del ARN subgenómico de la CP se extiende aguas abajo del codón de inicio de la traducción de este gen (Fig. 1). Con la finalidad de mejorar la estabilidad de este vector en tomate, se diseñaron dos nuevas construcciones, pBPepGFPm1 and pBPepGFPm2, basadas en la estructura de pBPepGFP2a. Para ello se introdujeron, por mutagénesis dirigida, una serie de modificaciones en

la secuencia duplicada. Para pBPepGFPm1, se introdujeron seis mutaciones sinónimas, una en cada uno de los seis últimos tripletes de nucleótidos de la secuencia duplicada, mientras que para pBPepGFPm2 se introdujeron mutaciones sinónimas en los doce últimos tripletes de la secuencia duplicada, con el objetivo de reducir aún más la duplicación de secuencia (Fig. 1). Posteriormente se llevaron a cabo ensayos de estabilidad en *N. benthamiana*. Para ello se agroinfiltraron hojas con *A. tumefaciens* transformado con pBPepGFPm1, pBPepGFPm2 y pBPepGFP2a en presencia del supresor de silenciamiento p19 y la expresión de la GFP fue monitorizada desde los 3dpi hasta los 12dpi bajo luz UV. Se detectaron niveles de expresión similares para los tres vectores en hoja inoculada a los 5dpi. A los 7dpi, la infección se hizo sistémica para los tres vectores, sin embargo, en las plantas infectadas con pBPepGFPm2 se observaron áreas más amplias de tejido fluorescente que en las plantas inoculadas con los otros dos vectores, diferencia que se acentuó a los 12dpi. Se tomaron muestras de hoja a los 7dpi en hoja inoculada y sistémica y a los 12dpi solo en hoja sistémica y se realizó una RT-PCR. Estos análisis revelaron la presencia de la banda correspondiente a la fusión GFP-2a-CP a 7dpi y 12dpi para todos los vectores, sin embargo, para PepGFP2a es posible intuir la banda correspondiente a la CP silvestre en todas las muestras. Para PepGFPm1 y PepGFPm2 solo se intuye la banda correspondiente a la CP silvestre a los 12 dpi. Se analizó la estabilidad del vector más prometedor, PepGFPm2 a lo largo de sucesivos pases, y se detectó expresión de GFP al menos durante tres pases. Para este vector se realizó también un estudio de estabilidad en tomate, pero solo se observaban focos aislados de GFP en un tercio de las plantas. Un análisis de RT-PCR desveló que este vector no era estable en tomate, no detectando la banda correspondiente a la fusión GFP-2a-CP a los 12dpi (ver a continuación), indicando la pérdida del inserto.

3.2. Expresión de DsRed y mCherry empleando el vector PepGFPm2 como molde

Partiendo de la hipótesis de que la selección negativa frente a una proteína fluorescente diferente a GFP podría ser menor en tomate, decidimos diseñar dos nuevos vectores basados en PepGFPm2 en el que reemplazamos el gen que codifica la *gfp* por el gen que codifica la *Dsred* y la *mCherry* (Fig.1). Posteriormente se inocularon plantas de *N. Benthamiana* con estos nuevos vectores en presencia del supresor de silenciamiento p19 y la fluorescencia fue monitorizada durante dos semanas bajo luz UV. Comparando la fluorescencia de estos dos nuevos vectores con la de PepGFPm2, a 5dpi, solo se observó fluorescencia de GFP en hoja inoculada, mientras que ya se detectó fluorescencia correspondiente a DsRed y mCherry en hoja sistémica, lo que sugiere que la infección del virus cuando porta el gen que codifica la *Dsred* y la *mCherry* se expande más rápidamente que cuando porta el gen *gfp*, además de que la expresión de estos dos genes reporteros sea más eficiente que la del gen *gfp*. A los 7 dpi, la fluorescencia se observaba ya en hoja sistémica para los tres vectores, sin embargo, era bastante más intensa para PepDsRed y PepmCherry, pudiendo ser comparada con la fluorescencia emitida por PepGFPm2 a los 12dpi. A los 12dpi la fluorescencia de PepmCherry comenzó a decaer, mientras que la de PepDsRed y PepGFPm2 se mantenía constante (Fig, 2a y 2b). Se realizó una RT-PCR a partir de extracciones de ARN de material infectado con PepDsRed y PepmCherry a 7 y 12dpi. Se observó que tanto la fusión DsRed-2a-CP como la mCherry-2a-CP se mantuvieron estables durante este periodo, no detectando en ningún momento banda correspondiente a la CP silvestre (Fig. 2c). Se realizaron también análisis de estabilidad a través de sucesivos pases, y se observó cómo la fluorescencia de DsRed y mCherry se mantuvo estable al menos durante tres pases, aunque la fluorescencia de mCherry en este último pase era bastante más débil. Se realizó una RT-PCR con las muestras de los pases a 7dpi y se observó cómo la banda correspondiente a la fusión DsRed-2a-CP se mantiene a lo largo de los pases, sin embargo, para la fusión mCherry-2a-CP en el tercer pase se observa una banda de tamaño correspondiente a la CP silvestre, indicando que eventualmente este vector pierde su integridad. Tras evaluar la estabilidad en *N. Benthamiana* se inocularon plantas de tomate con PepDsRed y PepmCherry. Se monitorizó la fluorescencia y se observó cómo bajo luz UV era posible detectar la fluorescencia de DsRed tanto en hoja inoculada como en hoja sistémica, sin embargo, en ningún momento se observó fluorescencia emitida por PepmCherry, al igual que

ocurría con PepGFPm2. Se realizó una RT-PCR que confirmó la estabilidad durante al menos 12 dpi para la fusión DsRed-2a-CP, mientras que para la fusión GFP-2a-CP y la mCherry-2a-CP solo se detectaron bandas débiles a los 7dpi, siendo mucho más intensa la señal correspondiente al producto de la CP silvestre. Se detectó fluorescencia durante al menos dos pases para el vector PepDsRed y análisis de RT-PCR mostraron la estabilidad de este vector durante los dos primeros pases, ya que en el tercero se detectó banda correspondiente a la CP. Resumiendo, el vector PepDsRed fue el vector más estable consiguiendo la expresión de la proteína fluorescente DsRed tanto en *N. Benthamiana* como en tomate.

4. CONCLUSIONES

Hemos mejorado la expresión de un vector basado en PepMV que expresa el gen de la *gfp*, a partir del cual hemos creado nuevos vectores que expresan el gen *DsRed* y *mCherry*, ampliando así el set de herramientas basadas en PepMV para su uso en estudios de mejora, patología y biología molecular.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradezco la financiación de la beca FPI a la Fundación Séneca de la Región de Murcia, y la financiación de los experimentos al proyecto de Plan Estatal AGL2015-65838-R (Ministerio de Economía y Competitividad).

6. REFERENCIAS

- [1] Aguilar JM., Hernandez-Gallarod MD., Cenis JL., Lacasa A., Aranda M. 2002 Complete sequence of the Pepino mosaic virus RNA genome. Arch Virol. 147:2009-2015.
- [2] Baulcombe DC., Chapman S., Cruz S., 1995 Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. Plant J 7:1045-1053.
- [3] Sempere RN., Gomez P., Truniger V., Aranda MA. 2011 Development of expression vectors based on pepino mosaic virus. Plant Methods. 7:6.

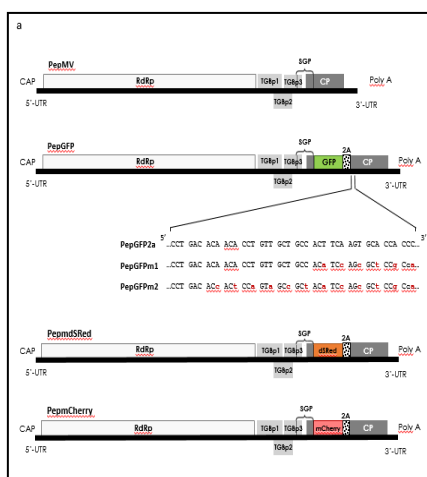


Figura 1. Representación esquemática de los vectores.

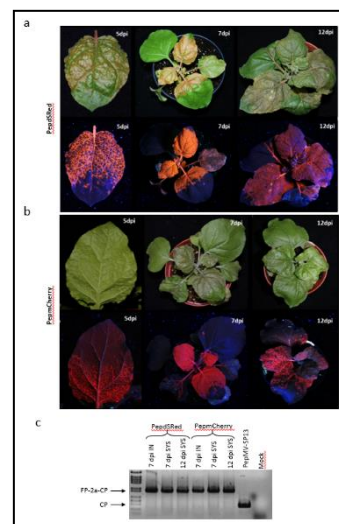


Figura 2. (a)(b) Expresión de dSRed y mCherry bajo luz UV en plantas inoculadas con los vectores que las expresan. (c) RT-PCR de plantas inoculadas los vectores que expresan dSRed y mCherry

Machine learning for leaf segmentation in NIR images based on wavelet transform.

Aprendizaje automatizado basado en transformadas wavelet para la segmentación de hojas en imágenes infrarrojas.

F. Pérez-Sanz^{1*}, P.J. Navarro², M. Egea-Cortines¹, J.Weiss¹

¹Genética. Instituto de Biología Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena. Cartagena (30202) Spain.

²División de Sistemas e Ingeniería Electrónica. Universidad Politécnica de Cartagena. Cartagena (30202) Spain.

*fernando.perez8@um.es

Abstract

In this work we present an algorithm to segment leaves in NIR images captured inside a growth chamber. The proposed method uses a features vector composed by four elements extracted from different levels of wavelets transform. We have tested three classifiers: k-nearest neighbour (kNN), Naive Bayes classifier (NBC) and Support Vector Machine to determine the optimal machine learning algorithm to carry out the leaf segmentation. Method developed has been validated by means of the Receiver Operating Characteristic (ROC) curve and it has obtained a maximum performance of 98.33% in the leaf segmentation using SVM classifier.

Keywords: Image processing; leaf detection; plant phenotyping.

Resumen

En este trabajo se presenta un algoritmo de segmentación basado en máquinas de aprendizaje para la segmentación de hojas sobre imágenes NIR (Near-Infra-Red). El método de segmentación utiliza un vector de características extraído de diferentes niveles de la transformada wavelet. Para el desarrollo del algoritmo se han probado tres clasificadores: el vecino más cercano (KNN), un clasificador Bayesiano (NBC) y las máquinas de soporte compacto (SVM). Los métodos de aprendizaje han sido validados mediante el análisis de las curvas ROC y el máximo rendimiento fue obtenido por la SVM con un 98.33%.

Palabras clave: Procesamiento de imagen; detección de hoja; fenotipado de plantas.

1. INTRODUCCIÓN

La segmentación de hojas de plantas es un punto clave en el fenotipado de plantas basado en visión artificial. La mayor parte de trabajos en este campo se centran en la detección de la masa vegetal completa más que de la hoja a nivel individual. Sin embargo, aplicar un algoritmo de visión en este campo no es algo trivial debido a dificultades como: (1) fondos de imagen no uniformes, (2) solapamiento de órganos, (3) similitud entre órgano y fondo y (4) cambios en la posición de los órganos respecto a la cámara. Rousseau et al [1] utilizaron el análisis multiescala de Fourier 2D sin ningún requisito para segmentar y detectar y contar hojas una a una. Aplicaron un algoritmo de clasificación supervisada capaz de contar las hojas desde 2 hasta 6 en las primeras etapas de crecimiento de la plántula desde una posición cenital. Cai et al [2] propusieron una novedosa técnica de segmentación de hojas basada en aprendizaje automatizado. Para obtener la

segmentación de los objetos, el algoritmo propuesto utiliza la diferencia entre imágenes para hacer una estimación inicial del fondo. Posteriormente mediante aprendizaje automatizado y técnicas de reconocimiento de patrones se refina la estimación. Los resultados experimentales han mostrado que este algoritmo, puede alcanzar un desempeño prometedor en términos de precisión y velocidad. Finalmente, Noble et al [3] presentaron un trabajo dirigido a la segmentación de las plantas de pepino mediante imágenes multispectrales. Los resultados concluyeron que la calidad de la luz tiene un impacto determinante en la calidad de la segmentación y que la banda de absorción de agua (970 nm) era generalmente la más efectiva para segmentar el fruto de la planta.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo el este trabajo, se ha capturado un conjunto de imágenes en el interior de una cámara de crecimiento configurable basada en visión artificial. La cámara se ha desarrollado pensando en análisis fenotípico relacionado con el ritmo circadiano [4-5] y está compuesta por tres subsistemas principales: (1) subsistema de iluminación, (2) subsistema de captura y (3) subsistema de procesamiento de imágenes. La modularidad del sistema permite múltiples configuraciones orientado a obtener grandes cantidades de imágenes para el análisis fenotípico. El sistema permite entre otras cosas: capturar imágenes con diferentes intervalos de disparo, tomar imágenes durante el día y durante la noche sin tener que iluminar en la fase nocturna, definir la duración del día y de la noche, y emplear diferentes tipos de cámaras.

El estudio presentado en este trabajo ha consistido en la medida de parámetros de crecimiento durante el periodo nocturno de dos tipos de especímenes de *Antirrhinum* (*A. majus* y *A. majus ssp. Linkianum*). Las imágenes se obtuvieron con una cámara multispectral JAI AD-080GE. Las imágenes han sido capturadas en el periodo nocturno con el sensor CCD NIR de la cámara, aplicando una iluminación LED en el infrarrojo cercano (NIR) a 890 nm por un periodo de 3 sg. durante la captura de la imagen. Esto es así porque largas exposiciones a la luz infrarroja puede afectar al desarrollo de la planta.

Para el experimento, la cámara se ha configurado en ciclos de 12/12h (día/noche) con imágenes capturadas cada 10 min. Durante 13 días. El número de imágenes NIR obtenidas ha sido por tanto de 6 imágenes/hora*12 horas/día*13 días = 936 imágenes de tamaño 1296x964 píxeles en escala de grises. La figura 1 (a) y (b) muestran dos imágenes capturadas durante el experimento.

La enorme cantidad de datos hace imposible la segmentación manual de las imágenes, por ello hemos diseñado un algoritmo basado en técnicas de aprendizaje automatizado para clasificar los objetos en dos clases: hoja y fondo. El algoritmo se ha dividido en 3 etapas:

(1) *Extraer regiones* de imágenes representativas de las diferentes clases y obtener un vector de características. Para ello se han seleccionado 150 regiones de 32x32 píxeles de cada clase. Esas 300 imágenes se han utilizado como conjunto de entrenamiento. Después se ha obtenido un vector de características basado en transformadas de wavelet con base de Haar. El vector de características está formado por 4 parámetros: máximo, mínimo, media y entropía de Shannon de los coeficientes de wavelet calculados para las subbandas horizontal, vertical y diagonal a dos niveles de descomposición.

(2) El *proceso de entrenamiento* se ha realizado con tres clasificadores: k vecinos más cercanos (kNN), un clasificador bayesiano (Nbc) y una máquina de soporte de vectores (SVM).

(3) *Proceso de segmentación*. En esta etapa el algoritmo se van extrayendo regiones de 32x32 píxeles de la imagen a segmentar, las regiones se van desplazando a lo largo de la imagen con solapamiento de píxeles (ventaneo). Para cada desplazamiento, se calculan los parámetros

wavelet tal como se hizo con las regiones de entrenamiento. A continuación los diferentes clasificadores deciden a qué clase asignan esa subregión de la imágenes (hoja o fondo). Finalmente se aplica un filtro de área para eliminar objetos demasiado pequeños (eliminar ruido). Las figuras 1 (c) y (d) muestran los resultados de la segmentación con el clasificador SVM.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hemos evaluado los resultados de implementar 3 clasificadores kNN, Nbc y SVM con el método de validación cruzada Leave-one-out cross-validation (LOOCV). El desempeño de los algoritmos de aprendizaje automatizado son normalmente evaluados mediante curvas ROC. Estas curvas son una representación gráfica de ratio de verdaderos positivos (sensibilidad) frente al ratio de falsos positivos (1 – especificidad) para diferentes puntos de corte. El área bajo la curva (AUC) suele utilizarse como medida de la calidad del clasificador y puede interpretarse como la probabilidad de que habiendo detectado un positivo, realmente sea un verdadero positivo. Los resultados de la evaluación de los 3 clasificadores puede verse resumida en la tabla 1, donde se puede observar que SVM y Naive Bayes han producido los mejores resultados con una precisión (AUC) del 98,33% y el 98,00% respectivamente.

4. CONCLUSIONES

En este trabajo hemos desarrollado un método para la segmentación de hojas basado en algoritmos de aprendizaje automatizado. Los métodos propuestos utilizan vectores de características calculados sobre transformadas wavelet. Hemos evaluado 3 algoritmos de aprendizaje diferentes: los k vecinos más próximos (kNN), el clasificador Naive Bayes (Nbc) y la máquina de soporte de vectores (SVM). La mejor clasificación la hemos obtenido con SVM con una eficacia superior al 98%. En un futuro, continuaremos trabajando en aspectos como la búsqueda de nuevos vectores de características que produzcan mejores resultados, reducción del tiempo de cálculo en el ventaneo y la implementación de los algoritmos en C o C++.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido parcialmente soportado por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) bajo los proyectos ViSelTR (TIN2012-39279) y cDrone (TIN2013-45920-R).

6. REFERENCIAS

- [1] Rousseau, D. 2015. Counting leaves without “finger-counting” by supervised multiscale frequency analysis of depth images from top view. *Proceedings of the Computer Vision Problems in Plant Phenotyping (CVPPP)*. (2015), 1–9. DOI:<https://doi.org/10.5244/C.29.CVPPP.2>.
- [2] Cai, J. 2011. Novel Image Segmentation Based on Machine Learning and Its Application to Plant Analysis. *IJIEE*. (2011). DOI:<https://doi.org/10.7763/IJIEE.2011.V1.12>.
- [3] Noble, S.D. and Li, D. 2012. Segmentation of Greenhouse Cucumber Plants in Multi-Spectral Imagery. *Proceedings of the International Conference of Agricultural Engineering* (Valencia, Spain, 2012).
- [4] Navarro, P.J. et al. 2012. Development of a configurable growth chamber with a computer vision system to study circadian rhythm in plants. *Sensors (Switzerland)*. 12, 11 (2012), 15356–15375. DOI:<https://doi.org/10.3390/s121115356>.
- [5] Navarro, P.J. et al. 2016. Machine Learning and Computer Vision System for Phenotype Data Acquisition and Analysis in Plants. *Sensors (Basel, Switzerland)*. 16, 5 (Jan. 2016), 641. DOI:<https://doi.org/10.3390/s16050641>.

Tabla 1: Eficacia de los clasificadores

Clasificador	kNN	Naive Bayes	SVM
AUC	96,67%	98,00%	98,33%

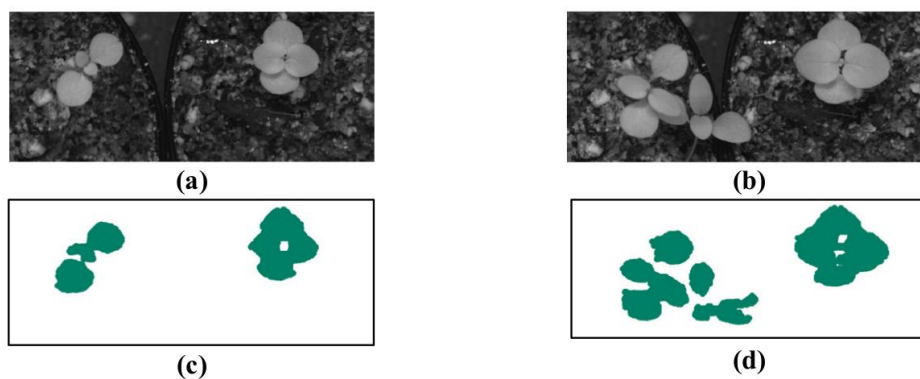


Figura 1: (a),(b) Imágenes NIR capturadas en la cámara de crecimiento; (c),(d) resultados.

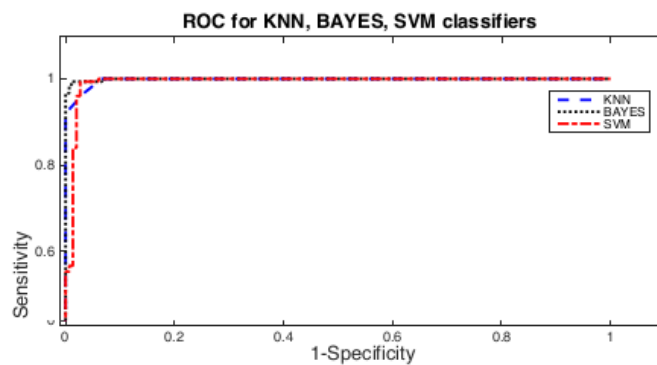


Figura 2: Curvas ROC para kNN, Naive Bayes y SVM.

Effect of silencing *PhZTL* in scent emission in Petunia (*Petunia x hybrida*)

Efecto del silenciamiento de *PhZTL* en la emisión de aromas en petunia (*Petunia x hybrida*)

M.I. Terry^{1*}, M. Egea-Cortines¹, J. Weiss¹

¹Genética Molecular, Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, 30202 Cartagena, Spain.

*marta.terry@edu.upct.es

Abstract

Organisms can anticipate to periodic changes in their environment thank to the circadian clock, a complex network of genes that form interlocked loops. Circadian clocks are also active in plants, regulating processes such as flower opening or scent emission in response to the environment. However, the role of the circadian clock in flower rhythms remains poorly understood. Here we analyzed the role of the clock gene *ZEITLUPE (ZTL)* in scent emission in petunia. Silencing *ZTL* altered the rhythmic emission of some organic compounds and also modified the scent profile of petunia flowers.

Keywords: Circadian clock; floral odor; rhythm; volatile organic compounds.

Resumen

Los organismos son capaces de anticiparse a los cambios cíclicos en su ambiente gracias al reloj biológico, un complejo red de genes que establecen bucles interconectados. Relojes circadianos también están activos en plantas, regulando procesos como la apertura de las flores o la emisión de aromas en respuesta al ambiente. Sin embargo, el papel del reloj circadiano sobre los ritmos de las flores es poco conocido. En el presente trabajo, analizamos el papel del gen reloj *ZEITLUPE (ZTL)* en la emisión de aromas en petunia. El silenciamiento de *ZTL* alteró el ritmo de emisión de algunos compuestos y también modificó el perfil aromático de la flor de petunia.

Palabras clave: Aroma floral; compuestos orgánicos volátiles; reloj circadiano; ritmo.

1. INTRODUCCIÓN

Los organismos están sujetos a cambios cíclicos en el ambiente, como la alternancia día-noche. Los seres vivos son capaces de anticiparse a estos cambios periódicos gracias al reloj biológico, que consta de diversos genes que establecen una serie de bucles. Estos relojes han sido ampliamente estudiados en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. En esta planta se ha propuesto un modelo de reloj, el cual está formado por tres bucles llamados central, de la mañana y de la tarde. Los genes que forman parte de este sistema (como *LHY* o *TOC1*) pueden actuar como activadores o represores de otros elementos del reloj [1]. Como resultado de estas interacciones, muchos de estos genes y las proteínas que codifican varían a lo largo del día.

En los últimos años, se han caracterizado relojes biológicos en otras especies de plantas con interés agronómico u ornamental, como el arroz (*Oriza sativa*) pero también en otras especies modelo, como la solanácea *Nicotiana attenuata*. Existen otras solanáceas con interés en investigación, como Petunia (*Petunia spp.*) que posee además interés como ornamental. En esta

especie se han realizado diversos estudios relacionados con la síntesis de pigmentos y compuestos orgánicos volátiles o con la emisión de aromas [2]. La emisión de compuestos orgánicos volátiles (VOCs por sus siglas en inglés) ha adquirido una especial relevancia ya que éstos desempeñan funciones tales como repeler herbívoros o atraer polinizadores, lo cual juega un papel importante en la polinización y en la producción. Además, se sabe que estos VOCs pueden variar a lo largo del día. Pese a que se conocen las rutas biosintéticas de estos compuestos, se desconoce qué papel desempeñan los genes del reloj en la regulación de la síntesis y emisión de aromas.

Por ello, en el presente estudio se abordará el estudio del efecto del gen reloj *ZEITLUPE* (*PhZTL*), que codifica una proteína que controla la degradación de *TOC1* y *PRR5* además de intervenir en la floración y en la emisión de volátiles en flores de petunia.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Transformación de petunia

Para silenciar el gen *PhZTL* se clonó un fragmento de 255 pb del mismo, empleando el vector pHELLSGATE12 [3]. Para la transformación se usó la línea silvestre (o *wild-type*, WT) W115 o Mitchell.

2.2 Material vegetal y condiciones de cultivo

Las plantas (tres por cada uno de los siguientes grupos: W115 y dos líneas transgénicas independientes de generación 2 o T2, denominadas *RNAi:ZTL3* y *RNAi:ZTL10*), crecieron en los invernaderos de la Finca Experimental Tomás Ferro. Para seleccionar las plantas transgénicas se realizó una PCR con cebadores específicos (*NPTII*, sentido: CCTGCTTGCCGAATATCATGGTGG, antisentido: CGAAATCTCGTGATGGCAGGTTGG) y de acorde al protocolo de la polimerasa (KAPABIOSYSTEMS). Las plantas se trasladaron a una cámara de cultivo días antes de la toma de muestras, donde fueron aclimatadas a días cortos (8 horas de luz y 23°C, 16 horas de oscuridad a 18°C). El inicio del día se definió como ZT 0 (*Zeitgeber time*).

2.3 Expresión génica

Se tomaron pétalos de flores de 2-3 días de edad cada 6 horas durante un ciclo de 24h. El tejido fue congelado inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenado a -80°C hasta la posterior extracción de ARN. La extracción de ARN total se realizó según [4]. Para la síntesis de ADNc (ADN complementario) se procedió según lo indicado por el fabricante (Maxima Reverse Transcriptase, Thermo Scientific). Para la PCR a tiempo real o cuantitativa (qPCR) se empleó el sistema Mx3000P (Agilent Technologies) y SYBR Green Master Mix (Takara, Clontech), según los respectivos manuales, con las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial de 95°C durante 30" seguida de 40 ciclos a 95°C durante 5", 60°C 20" y 72°C 15". Como genes de referencia se usaron *EF1α* y *CYP* [5] y las siguientes secuencias de *PhZTL* sentido TGCATCTGTTGGCTCTGTTT y antisentido CCCCAACCAATCTCTTAGC. La expresión génica se calculó con el programa REST 2008 (<http://www.gene-quantification.de/rest-2008.html>).

2.4 Emisión de volátiles

La recolección de volátiles se realizó según lo descrito por [6], utilizando un recipiente de cristal en lugar de uno plástico y una flor cortada de 2-3 días por cada réplica biológica. El muestreo se llevó a cabo cada 3 horas durante un ciclo de 24 horas en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior. Para representar los datos de los compuestos seleccionados, se dividió el área integrada de cada pico por el peso en fresco de la flor. Además, se usó la librería "MetaCycle" [7] (R v.3.2.2) para detectar ritmos en la emisión de volátiles.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La expresión de *ZTL* en pétalo fue menor en ambas líneas bajo días cortos (Fig. 1A).

Por otro lado, seleccionamos 13 VOCs para su posterior análisis (no se muestran todos). Dichos compuestos pertenecían a la ruta de los fenilpropanoides y bencenoides; la mayoría aumentaron su emisión durante la noche (benzoato de metilo, Fig. 1B) [4], y está sincronizada a la actividad de sus polinizadores [8]. Sin embargo, observamos una serie de diferencias entre silvestres y líneas RNAi. Primero, algunos de estos compuestos, como el alcohol bencílico, adelantaron su máximo o pico de emisión respecto al silvestre, mientras que otros, como el acetato de bencilo, retrasaron este máximo (tabla 1). Por otro lado, el periodo (definido con el tiempo transcurrido entre dos picos, es decir, un ciclo completo) para algunos compuestos, como el acetato de bencilo, fue mayor en las plantas transgénicas (24h) comparado con las silvestres (21h). Además, el perfil aromático, definido como la contribución de cada compuesto individual al aroma, también varió; así la proporción de benzaldehído emitida por las flores *RNAi:ZTL* aumentó un 11% pero el fenilacetaldehído descendió ligeramente, entre 3-4%, en las líneas transgénicas (Fig. 1C). Estudios previos sobre el silenciamiento de genes reloj mostraron una alteración de los ritmos de apertura de las flores y la emisión de VOCs [9,10]. Sin embargo, dichos estudios no analizaron los posibles cambios en el perfil aromático; dichos cambios podrían alterar las interacciones con polinizadores, herbívoros incluso planta-planta.

4. CONCLUSIONES

El silenciamiento de *PhZTL* en petunia parece alterar tanto el ritmo de emisión de ciertos compuestos volátiles como la cantidad emitida, modificando al perfil aromático típico de esta especie.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido desarrollado bajo los proyectos Fundación Séneca 19398/PI/14 y BFU-2013-45148-R. Agradecemos a María José Roca la ayuda prestada en el manejo del GC-MS.

6. REFERENCIAS

- [1] Pokhilko A., Fernández A.P., Edwards K.D., Southern M.M., Halliday K.J., Millar A.J. 2012. The clock gene circuit in Arabidopsis includes a repressilator with additional feedback loops. *Mol. Sys. Biol.* 8(1): 574.
- [2] Kolosova N., Gorenstein N., Kish C.M., Dudareva N. 2001. Regulation of circadian methyl benzoate emission in diurnally and nocturnally emitting plants. *Plant. Cell.* 13(10): 2333-2347.
- [3] Helliwell C., Waterhouse P. 2003. Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods.* 30(4): 289-295.
- [4] Box M.S., Coustham V., Dean C., Mylne J.S. 2011. Protocol: A simple phenol-based method for 96-well extraction of high quality RNA from Arabidopsis. *Plant. Methods.* 7(1): 7.
- [5] Mallona I., Lischewski S., Weiss J., Hause B., Egea-Cortines M. 2010. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. *BMC. Plant. Biol.* 10(1): 4.
- [6] Manchado-Rojo M., Delgado-Benarroch L., Roca M.J., Weiss J., Egea-Cortines M. 2012. Quantitative levels of *Deficiens* and *Globosa* during late petal development show a complex transcriptional network topology of B function. *Plant. J.* 72(2): 294-307.
- [7] Wu G., Anafi R.C., Hughes M.E., Kornacker K., Hogenesch J.B. 2016. MetaCycle: an integrated R package to evaluate periodicity in large scale data. *Bioinformatics.* 32(21): 3351-3353.

[8] Hoballah M.E., Stuurman J., Turlings T.C., Guerin P.M., Connetable S., Kuhlemeier C. 2005. The composition and timing of flower odour emission by wild *Petunia axillaris* coincide with the antennal perception and nocturnal activity of the pollinator *Manduca sexta*. *Planta*. 222(1): 141-150.

[9] Fenske M.P., Hazelton K.D.H., Hempton A.K., Shim J.S., Yamamoto B.M., Riffell J.A., Imaizumi T. 2015. Circadian clock gene *LATE ELONGATED HYPOCOTYL* directly regulates the timing of floral scent emission in *Petunia*. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. 112(31): 9775-9780.

[10] Yon F., Joo Y., Cortés Llorca L., Rothe E., Baldwin I.T., Kim S.G. 2016. Silencing *Nicotiana attenuata* LHY and ZTL alters circadian rhythms in flowers. *New. Phytol.* 209(3): 1058-1066.

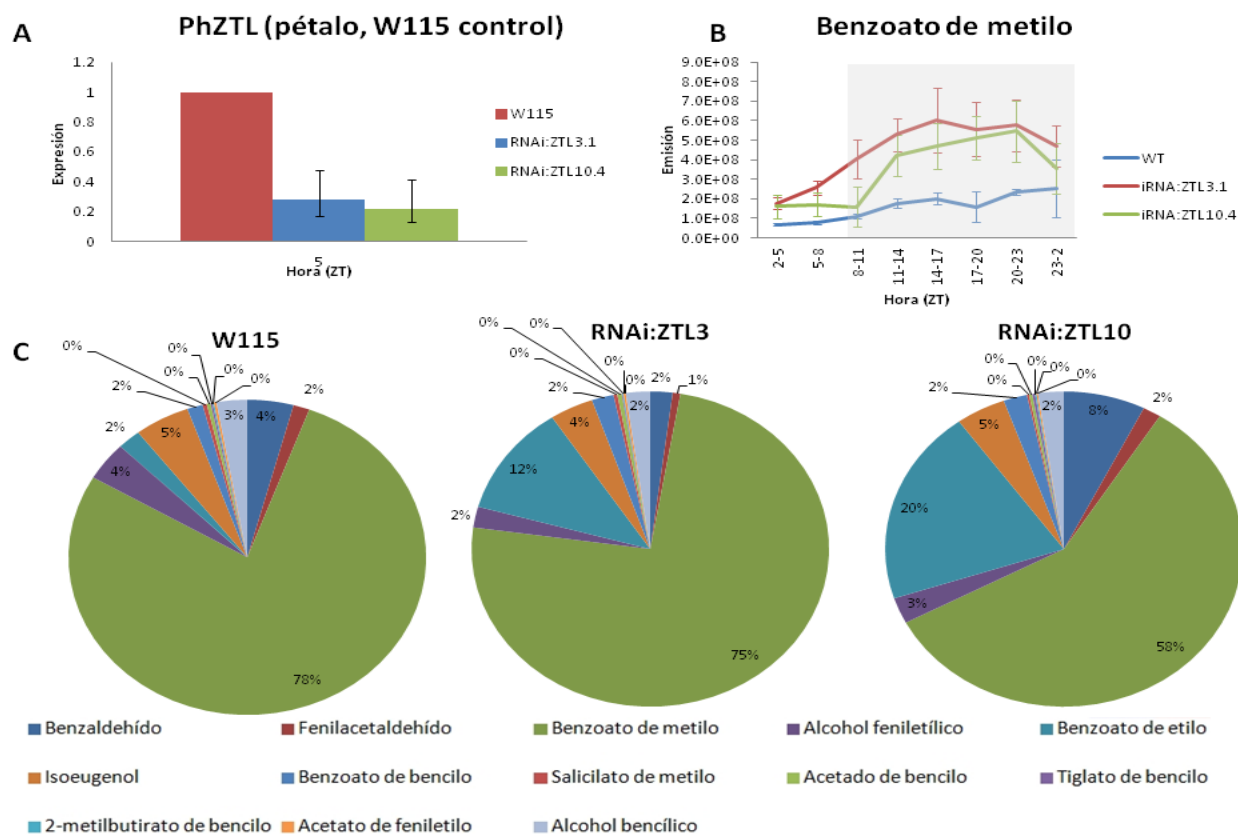


Figura 1. A) Expresión de *PhZTL* en pétalo de petunia. B) Emisión del benzoato de metilo a lo largo de 24h. C) Perfil aromático, representando la emisión total en 24 h.

Tabla 1. Detección de ritmos de dos de los volátiles analizados con MetaCycle. W115 es el silvestre, RNAi:ZTL3 y 10 son líneas transgénicas. Un valor $P < 0,05$ indica que el compuesto mostró una emisión rítmica. La fase se define como el punto (en horas) con la máxima emisión.

Volátil	Parámetro	W115	RNAi:ZTL3	RNAi:ZTL10
Alcohol bencílico	Valor P	4,07e-05	6,71e-03	4,07e-05
	Fase	21,5	20	20
Benzoato de bencilo	Valor P	0.00	0.02	0.00
	Fase	15,5	17	17

Shoot induction and plant regeneration of *Limonium sinuatum* from young leaves

Inducción de brotes y regeneración de plantas de *Limonium sinuatum* a partir de hojas jóvenes

J. Sánchez^{1,2*}, A. A. Calderón¹

¹Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria. Área de Fisiología Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena. Spain.

²Barberet & Blanc, S.A. by Dümme Orange. Puerto Lumbreras, Murcia. Spain.

*jesus.tecnologia@hotmail.com

Abstract

The success of micropropagation of *Limonium sinuatum* depends on the establishment phase. The most suitable explant should be selected to ensure a good introduction to laboratory conditions. This paper presents the results of the tests carried out with four varieties of different colours of *L. sinuatum*, SN8946, SN9013, SN9000 and SN9001, using as starting material 5 x 5 mm pieces taken from young leaves as an alternative to the immature inflorescences. The explants were tested in four treatments with Murashige and Skoog (MS) culture media supplemented with different concentrations of the cytokinins N⁶-benzyladenine (BA) or Thidiazuron (TDZ), in the presence or absence of the auxin indoleacetic acid (AIA). Among the determinations made were the percentage of contaminated explants and surviving explants, the percentage of explants with callus and that of tubes with plants. Stem production and length were also measured during the greenhouse culture phase. The establishment using young leaves was only viable for the SN9000 variety, showing the best results when the medium was supplemented with BA and AIA, thus establishing an alternative to the current method.

Keywords: Statice; *in vitro* establishment; Thidiazuron.

Resumen

El éxito de la micropropagación de *Limonium sinuatum* depende de la fase de establecimiento. Se debe seleccionar el explante más idóneo para asegurar una buena introducción a las condiciones de laboratorio. Este trabajo presenta los resultados de los ensayos realizados con cuatro variedades de distintos colores de *L. sinuatum*, SN8946, SN9013, SN9000 y SN9001, usando como explante de partida trozos de 5 x 5 mm obtenidos de hojas jóvenes como alternativa a las inflorescencias inmaduras. Los explantes se ensayaron en cuatro tratamientos con medios de cultivo Murashige y Skoog (MS) suplementados con diferentes concentraciones de las citoquininas N⁶-benciladenina (BA) y Thidiazuron (TDZ), en presencia o ausencia de la auxina ácido indolacético (AIA). Entre las determinaciones realizadas, se tomaron medidas del porcentaje de explantes contaminados, de explantes supervivientes, de explantes con callo y de tubos con plantas. También se midió la producción y la longitud del tallo durante el cultivo en invernadero. El establecimiento utilizando hojas jóvenes sólo fue viable para la variedad SN9000, mostrando los mejores resultados cuando el medio fue suplementado con BA y AIA, estableciéndose así una alternativa al método usado en la actualidad.

Palabras clave: Limonio; establecimiento *in vitro*; Thidiazuron.

1. INTRODUCCIÓN

Limonium sinuatum, especie perteneciente a la familia de las Plumbagináceas es muy apreciada tanto para su venta como flor seca como para flor en fresco.

En la producción comercial de esta especie se usaban semillas o esquejes, pero el periodo necesario para obtener plantas oscilaba entre 6-8 meses, con rendimientos bajos y gran heterogeneidad [1]. Por este motivo, actualmente, se multiplican las plantas en laboratorio bajo condiciones controladas usando la propagación *in vitro* o micropropagación. Para utilizar esta técnica se requiere optimizar todas las fases, desde el método de establecimiento [2], a la elección del método de cultivo, pasando por la composición de los medios de cultivo (nutrientes y hormonas) [3].

La empresa Barberet & Blanc, S.A. by Dümme Orange localizada en el municipio de Puerto Lumbreras (Murcia), lleva a cabo entre sus actividades, la mejora genética y obtención de variedades nuevas de *Limonium sinuatum*. Como para el establecimiento y multiplicación se utilizan técnicas *in vitro*, es muy importante mejorar todas las fases de la micropropagación.

El objetivo de este trabajo es conocer si se puede proponer un método alternativo de establecimiento *in vitro* a partir de explantes de hojas jóvenes que sustituya al protocolo actualmente usado, basado en la utilización de inflorescencias inmaduras, eliminando así el problema que supone la variación somaclonal y manteniendo un elevado porcentaje de éxito en el proceso. Se han realizado los ensayos con cuatro variedades de distintos colores SN8946 (violeta), SN9013 (blanco), SN9000 (amarillo) y SN9001 (rosa), siendo solamente la variedad amarilla la que respondió de manera satisfactoria.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

El material de partida se tomó de plantas adultas de las cuatro variedades descritas y cultivadas en invernadero, de las que se seleccionaron hojas jóvenes de 2 cm de longitud. Estas hojas se esterilizaron siguiendo un protocolo que consistió en un lavado con agua y jabón, 30 segundos en alcohol de 70°, 15 minutos en una disolución de hipoclorito sódico al 1% y por último, tres enjuagues con agua destilada y estéril. De estas hojas se tomaron trozos de 5 x 5 mm incluido el peciolo para ensayarlos en los distintos tratamientos. Las condiciones de la cámara de cultivo durante el establecimiento fueron de 22 °C, humedad relativa de 45-50%, iluminación de 96,2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$, concentración de CO_2 ~800 ppm y un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad).

Al finalizar el periodo de establecimiento, el material obtenido se propagó en las mismas condiciones de temperatura, iluminación, concentración de CO_2 y humedad relativa.

2.2 Tratamientos y análisis estadístico

Como medio de cultivo basal se utilizó el descrito por Murashige y Skoog (MS) [4]. El pH del medio se ajustó a 5,8, con una concentración de agar del 0,9% (p/v) y se autoclavó a 121 °C y 104 kPa. Los explantes foliares se sometieron a los siguientes tratamientos: T-1, con una concentración de BA de 0,25 mg/L como citoquinina (control, usado normalmente como medio de establecimiento), T-2, con TDZ a una concentración de 0,25 mg/L, T-3, con 0,25 mg/L de BA más 0,50 mg/L de AIA, y T-4, con 0,25 mg/L de TDZ más 0,50 mg/L de AIA. Cada experimento se repitió tres veces, utilizando 25 explantes por tratamiento y variedad. Al finalizar la fase de establecimiento (60 días) se calculó el porcentaje de explantes contaminados y supervivientes, de explantes con callo y de tubos con plantas. Los nuevos brotes se subcultivaron durante 35 días en un medio MS modificado con 0,20 mg/L de BA. En la fase de cultivo en invernadero se midió la producción (tallos/plantas) y longitud del tallo (cm) para determinar la calidad agronómica y comercial. Todos los datos fueron estudiados con un análisis de la varianza (ANOVA) usando el

programa IBM SPSS Statistics 20 con un nivel de significación $\alpha=0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Contaminaciones y establecimiento

En las variedades SN8946, SN9013 y SN9001 el valor más alto de explantes supervivientes estuvo siempre por debajo del 16% (T-4 en SN9013), no apareciendo ninguna planta para estos tratamientos en ninguno de estos cultivares (Tabla 1).

Para la variedad SN9000 el porcentaje de contaminaciones estuvo por debajo del 30%, un valor muy significativo, si se tiene en cuenta que en el establecimiento a partir de inflorescencia inmadura este valor está sobre el 50-60%. Así, la supervivencia de explantes estuvo por encima del 70% para todos los tratamientos. A pesar de esto, el T-1 tuvo un número de explantes con callo muy bajo, estando el resto de tratamientos cercanos al 25%, como T-2 y T-4, y por encima de este valor en T-3. Además, se observó que solamente los tratamientos T-2 con un 14,62% de los tubos y el T-3 con un 31,93% de los tubos, mostraron plantas que pasaron a la fase siguiente para realizar una posterior multiplicación (Tabla 1).

3.2 Crecimiento, tasa de multiplicación, peso fresco y peso seco

La variedad SN9000 presentó datos de crecimiento similares entre tratamientos de manera que las variaciones estuvieron entre 1,98 y 2,55 centímetros sin mostrar diferencias significativas. Sin embargo, si hubo diferencias entre el método utilizado comercialmente, basado en inflorescencias, y el T-3 con respecto a la tasa de multiplicación (Tabla 2). Aun así el T-3, con 1,20 brotes por planta, se puede considerar aceptable.

En cuanto al peso fresco y peso seco se observó que no había diferencias significativas entre los tratamientos estudiados (Tabla 2).

3.3 Producción y parámetros de calidad

La producción en el tratamiento control (aplicado a inflorescencias) y T-2 con BA y con BA más AIA, respectivamente, no llegó al valor de 8 tallos por planta y corte que se exige comercialmente, si bien se obtuvieron valores muy cercanos (7,5 y 7). El T-3 superó el valor esperado, presentando diferencias significativas con el T-2 (Figura 1).

Todas las plantas de los distintos tratamientos de la variedad ensayada SN9000 de color amarillo presentaron una altura de tallo por encima de 60 centímetros (Figura 2), cumpliendo con la calidad extra. Además, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos.

4. CONCLUSIONES

Para las variedades SN8946, SN9013 y SN9001 este método de introducción, con los fitorreguladores y dosis ensayadas, no es efectivo para un establecimiento *in vitro* adecuado.

En cuanto a la variedad de color amarillo, SN9000, se observa que los tratamientos T-2 y T-3 son efectivos para la regeneración de plantas a partir de hojas jóvenes. Además, como solo se observan diferencias en los parámetros de calidad, con una producción más alta para T-3, este tratamiento se podría adoptar como un nuevo método de establecimiento para la variedad.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está siendo financiado por la empresa Barberet & Blanc, S.A. by Dümme Orange. También se han utilizado las instalaciones del Instituto de Biotecnología Vegetal de la UPCT.

6. REFERENCIAS

- [1] Fujita, M. 1993. Breeding and Cultivation: Statice (*Limonium*). (Seibunndo-Shinkosha Co. Ltd. Tokyo). Pp 136-150.
- [2] Igawa, T., Hoshino, Y. and Mii, M. 2002. Efficient plant regeneration from cell cultures of ornamental statice, *Limonium sinuatum* Mill. In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant. 38: 157-162.
- [3] Jeong, J.H., Murthy, H.N. and Paek, K. 2001. High frequency adventitious shoot induction and plant regeneration from leaves of statice. Plant Cell Tissue. Organ Cult. 65: 123-128.
- [4] Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.

Tabla1. Parámetros de establecimiento *in vitro* a partir de explantes de hojas jóvenes.

Variedad	Tratamiento	Contaminados 60 días (%)	Explantes supervivientes (%)	Explantes con callo (%)	Tubos con plantas (%)
SN8946	T-1	70.69 ± 3.39a	29.31 ± 3.39b	1.39 ± 0.95a	0.00 ± 0.00a
	T-2	54.89 ± 1.37b	45.10 ± 1.37a	2.90 ± 1.45a	0.00 ± 0.00a
	T-3	77.55 ± 2.99a	22.45 ± 2.99b	0.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00a
	T-4	54.63 ± 2.4b	45.37 ± 2.45a	1.39 ± 1.39a	0.00 ± 0.00a
SN9013	T-1	13.72 ± 3.71b	86.28 ± 3.07a	6.83 ± 2.31bc	0.00 ± 0.00a
	T-2	37.20 ± 3.17a	62.80 ± 3.16b	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00a
	T-3	14.35 ± 2.96ab	85.65 ± 2.96a	10.34 ± 1.46ab	0.00 ± 0.00a
	T-4	13.12 ± 2.96b	86.88 ± 2.96a	16.20 ± 2.81a	0.00 ± 0.00a
SN9000	T-1	29.09 ± 3.02a	70.91 ± 3.02b	6.52 ± 1.74b	0.00 ± 0.00c
	T-2	28.00 ± 2.31a	72.00 ± 2.31b	24.00 ± 6.11ab	14.67 ± 2.67b
	T-3	5.23 ± 2.61b	94.77 ± 2.61a	39.83 ± 3.71a	31.93 ± 1.57a
	T-4	24.07 ± 2.58a	75.93 ± 2.58b	25.15 ± 2.54ab	0.00 ± 0.00c
SN9001	T-1	64.99 ± 6.04a	35.01 ± 6.04a	1.39 ± 1.39ab	0.00 ± 0.00a
	T-2	55.01 ± 2.93ab	44.98 ± 2.93a	2.90 ± 1.45ab	0.00 ± 0.00a
	T-3	51.71 ± 2.77ab	48.29 ± 2.77a	0.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00a
	T-4	62.41 ± 2.22b	37.58 ± 2.22a	7.37 ± 0.56a	0.00 ± 0.00a

*Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas entre los valores (Tukey HSD, p<0.05)

Tabla2. Parámetros de multiplicación *in vitro* de SN9000.

Tratamiento	Crecimiento (cm)	Tasa de multiplicación (brotes/planta)	Peso fresco (g/planta)	Peso seco (g/planta)
Comercial	1.98 ± 0.01a	1.44 ± 0.06a	1.09 ± 0.24a	0.07 ± 0.01a
T-2	2.08 ± 0.06a	1.23 ± 0.02ab	2.49 ± 0.83a	0.16 ± 0.04a
T-3	2.55 ± 0.34a	1.20 ± 0.06b	1.29 ± 0.32a	0.09 ± 0.02a

*Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas entre los valores (Tukey HSD, p<0.05)

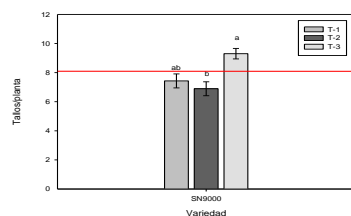


Figura 1. Efecto del establecimiento a partir de hojas jóvenes sobre la producción de SN9000 en plantas cultivadas en invernadero.

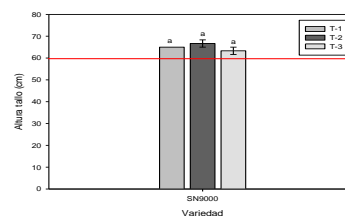


Figura 2. Efecto del establecimiento a partir de hojas jóvenes sobre la longitud del tallo de SN9000 en plantas cultivadas en invernadero.

Design of guide RNA for gene editing of *Gigantea* in Solanaceae

Diseño de ARN guía para la edición del gen *Gigantea* en Solanáceas

C. Brandoli^{1*}, C. Petri Serrano^{1,2}, J. Weiss^{1,2}

¹ Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, calle Linterna s/n, Campus Muralla del Mar, 30203, Cartagena, Murcia, Spain.

² ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena, Murcia, Spain.

*claudio.brandoli@gmail.com

Abstract

The CRISPR/Cas9 system nowadays has become the most used genome editing technology in the scientific world. Although this technique is in constant evolution, one of the main problems that persists is the lack of solid bioinformatics tools for the design of guide-RNAs (gRNA) for different species with high effectiveness and specificity. Here, we describe the methodology of design and generation of gRNA for genome editing through CRISPR/Cas9 technology in Solanaceae.

Keywords: Targeted mutagenesis; gRNA design; gRNA efficacy; CRISPR/Cas9.

Resumen

El sistema CRISPR Cas9 se ha convertido hoy en día, en la tecnología de edición genómica más utilizada en el mundo científico. Aunque se encuentra en constante evolución, uno de los principales problemas que persiste es la falta de herramientas bioinformáticas sólidas para el diseño de ARN guía (gRNA) para diferentes especies con alta efectividad y especificidad. Aquí, describimos la metodología de diseño y generación de sgRNAs para la edición del genoma a través la tecnología CRISPR/Cas9 en Solanáceas.

Palabras clave: Mutagénesis dirigida; diseño del gRNA; eficacia del gRNA; CRISPR/Cas9.

1. INTRODUCCIÓN

El sistema CRISPR/Cas9-sgRNA, es una tecnología que se ha desarrollado en los últimos años para facilitar la edición del genoma en células eucariotas. Resulta de una estrategia adaptativa que las bacterias y arqueas utilizan para luchar contra virus y plásmidos invasores(1)(2). Más precisamente, se trata de un almacenamiento de secuencias de ADN de virus o plásmidos, que derivan de invasiones anteriores, en una matriz de transcripción llamada CRISPR. Cuando el mismo tipo de virus invade de nuevo la célula, el sistema es capaz de reconocerlo usando las secuencias de ARN transcritas y direccionar un complejo enzimático compuesto también por una nucleasa al sitio diana para cortar a la doble hebra de ADN (Double Strand Break (DSB)). Este sistema está compuesto por tres componentes esenciales, dos de ARN, un CRISPR-ARN maduro (crRNA) y un ARN transactivador (tracrRNA). Estos dos, tienen una complementariedad de secuencia parcial y juntos forman una estructura bien definida llamada ARN guía única (sgRNA)(3)(4). La especificidad del sistema depende de la complementariedad de 20 pares de bases del gRNA, en el extremo 5 'del sgRNA. El otro componente, es la nucleasa Cas9 que deriva de la bacteria *Streptococcus pyogenes*, capaz de cortar la doble hebra de ADN con alta

especificidad, (5). Una vez que el Cas9 crea un DSB, el sistema de reparación celular puede reparar el daño a través de unión no homóloga (NHEJ) o de recombinación homóloga (HR), generando mutaciones o deleciones o inserciones en la secuencia diana (6). Otro componente es el codón PAM, una secuencia caracterizada por tres nucleótidos. Localizada inmediatamente después de la secuencia de ADN diana, es esencial para que la nucleasa Cas9 identifique el lugar específico donde realizar el DSB. Esta breve secuencia está compuesta por tres nucleótidos de los cuales dos tienen que ser guaninas (NGG).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Las especies estudiadas han sido *Nicotiana benthamiana* y *Petunia hybrida*, ambas pertenecientes a la familia de las *Solanáceas*. Estas son hoy en día, plantas modelo ampliamente utilizadas en investigación.

2.2 Diseño del gRNA

Los gRNA deben tener una alta especificidad para la secuencia diana. Para lograr este objetivo, hemos utilizado el software online Tcoffee (<http://tcoffee.crg.cat/>), para sobreponer el cDNA de la secuencia de *Gigantea* y de sus alelos. Posteriormente, hemos seleccionado las secuencias que flanqueaban los codones PAM. De estas secuencias hemos seleccionado solo las que estaban más cerca a la secuencia del promotor del gen (zona 5') y que por lo tanto, tienen más probabilidad de causar un efecto relevante a la hora de producir el corte a la doble hebra. De las gRNA seleccionadas, se seleccionó la que cumplía los parámetros hoy en día reconocidos como esenciales para que un gRNA tenga alta eficacia y especificidad, como:

- contenido de C/G entre el 40% y el 80%;
- no más de 12 emparejamiento de bases totales (TBPs) y 7 de emparejamiento de bases consecutivas (CBPs), entre la secuencia guía y las otras secuencias (crRNA y tracrRNA) (7);
- en la posición 20, una Citosina está altamente desfavorecida y una Guanina está muy favorecida (8);
- la longitud ideal de la secuencia guía debe ser de 20 pb, (N₂₀)NGG,(9).

2.2 Construcción molecular del vector

A través de una serie de PCR solapantes, hemos conseguido modificar la estructura del plásmido de clonaje diseñado por el Jen Sheen Lab, del Massachusetts General Hospital de Boston (8), e insertar nuestra secuencia guía complementaria a la secuencia diana de *Gigantea*. Las PCR se llevaron a cabo siguiendo protocolos descritos por otros autores (10) (figura 1). Los cebadores utilizados están enumerados en la tabla 1. Hemos insertado el producto de PCR, a través del método de clonación Gateway® (<https://www.thermofisher.com/>) en el vector de clonación mencionado anteriormente. Para la transformación en planta se aplicó la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*.

2.3 Comprobación molecular de los clones

Las construcciones se comprobaron mediante PCR con los cebadores Crispr For1, Crispr Rev2 y attB1, attB2 (tabla 1) (figura 2). Los productos de PCR se evaluaron por análisis en gel de agarosa al 1%, (Figura 2).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Gracias al software online Tcoffee (<http://tcoffee.crg.cat/>) detectamos unas secuencias entre 20 y 25 bp altamente conservadas entre las dos especies objeto de nuestro estudio. Después de la selección según las características enumeradas anteriormente, hemos identificado una secuencia de 20 bp idónea para nuestro estudio (figura 3). Del experimento se ha obtenido un

plásmido binario modificado por una serie de PCRs solapantes (figura 4). Esta construcción lleva nuestro fragmento representante el ARN-guía, junto con el scaffold para formar el sgRNA. Los dos están bajo control del promotor AtU6 (figura 4).

Este trabajo forma parte de un proyecto de tesis donde se pretende analizar los cambios fenotípicos y bioquímicos inducidos por el silenciamiento/modificación de los genes *Gigantea* en Solanáceas con el objetivo de profundizar en el conocimiento de la función de este gen y su posible regulación.

4. AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer al Instituto de Biotecnología Vegetal (IBV), especialmente a mi director y codirector de tesis, la Dra. Julia Weiss y al Dr. Cesar Petri Serrano por su disposición y su valioso asesoramiento. Esta obra forma parte de los proyectos BFU-2013-45148-R y Seneca 19398/PI/14.

6. REFERENCIAS

- [1] Koonin E V, Makarova K S (2009). CRISPR-Cas: an adaptive immunity system in prokaryotes. *F1000 Biol Rep*, 1: 95
- [2] Koonin E V, Makarova K S (2013). CRISPR-Cas: evolution of an RNAbased adaptive immunity system in prokaryotes. *RNA Biol*, 10(5): 679–686
- [3] Institutes, K. N. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes, (August 2016). <http://doi.org/10.1126/science.1159689>
- [4] Zhu, L. J. (2015). Overview of guide RNA design tools for CRISPR-Cas9 genome editing technology, *10(4)*, 289–296. <http://doi.org/10.1007/s11515-015-1366-y>
- [5] Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., & Ran, F. A. (n.d.). DNA Targeting Specificity of the RNA-guided Cas9 Nuclease. <http://doi.org/10.1038/nbt.2647>
- [6] Institutes, K. N. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes, (August 2016). <http://doi.org/10.1126/science.1159689>
- [7] Li, J., Aach, J., Norville, J. E., McCormack, M., Bush, J., Church, G. M., & Sheen, J. (2014). NIH Public Access, *31(8)*, 688–691. <http://doi.org/10.1038/nbt.2654.Multiplex>
- [8] Liang, G., Zhang, H., Lou, D., & Yu, D. (2016). Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR / Cas9-based plant genome editing. *Nature Publishing Group*, 1–8. <http://doi.org/10.1038/srep21451>
- [9] To, L., & Editor, T. H. E. (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR / Cas system, 1229–1232. <http://doi.org/10.1038/cr.2013.114>
- [10] Zhu, L. J. (2015). Overview of guide RNA design tools for CRISPR-Cas9 genome editing technology, *10(4)*, 289–296. <http://doi.org/10.1007/s11515-015-1366-y>

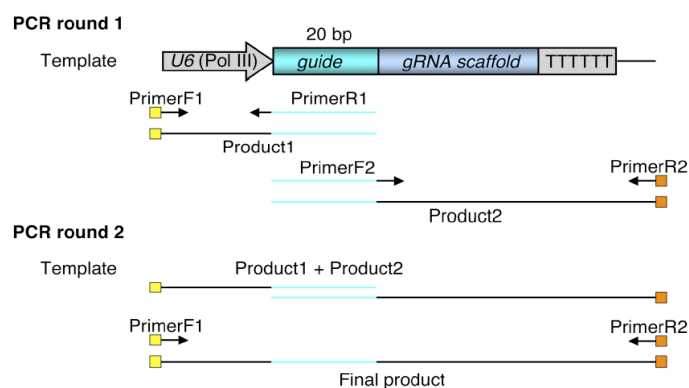


Figura 1. Diagrama del ensamblaje de una nueva construcción del gRNA. A través de una serie de PCR solapantes, es posible insertar el fragmento guía.

Tabla 1. Cebadores utilizados

PRIMERS	Secuencias
Crispr For1	CAAAAAGCAGGCTAGAAATCTCAAATTCGG
Crispr Rev1	CTCGACAAGCATCCCATCTGTAATCACTACTTCGTCTCT
Crispr For2	ACAGATGGGATGCTTGTGCGAGTTTGTAGAGCTAGAAATAGC
Crispr Rev2	CAAGAAAGCTGGGTATAATGCCAACTTTGTACA
attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA

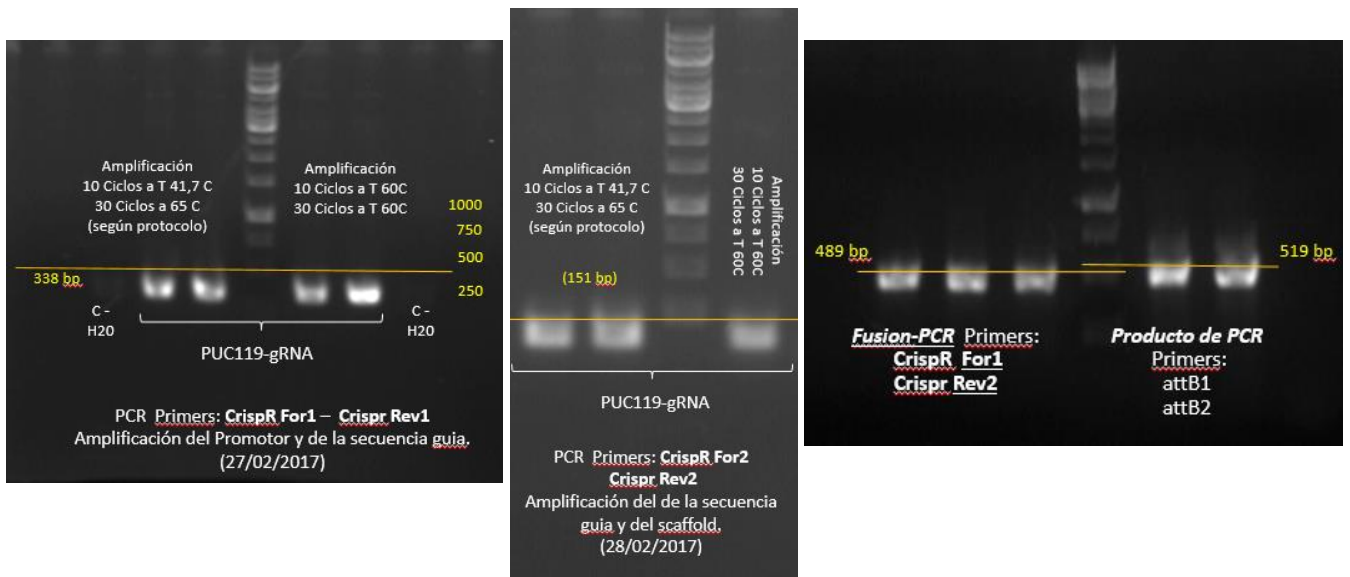


Figura 2. PCRs solapantes para la construcción del sRNA.

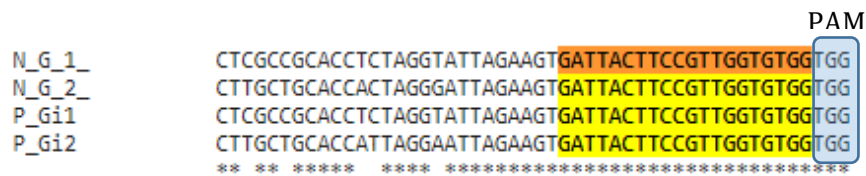


Figura 3. Superposición de secuencias e identificación de un fragmento de 20 bp altamente conservado, adecuado como guía para el complejo CRISPR.

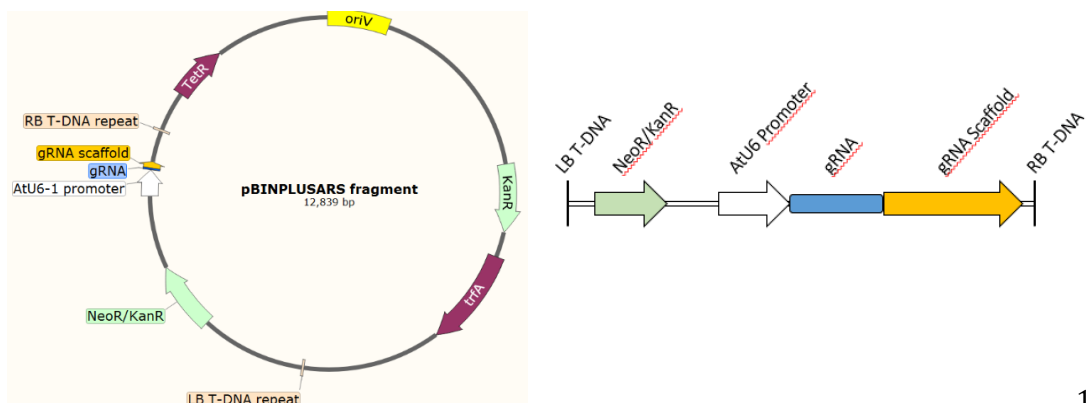


Figura 4. Mapa de la región entre el LB y el RB del T-DNA, incluido el fragmento guía de ARN. Los principales componentes están indicados.

POSTER SESSION I:
Food Technology and
Engineering

Healthier and gluten-free refrigerated breaded meat products

Productos cárnicos empanados refrigerados sin gluten y más saludables

I. Pérez^{1*}, J. Maté², A. López³

^{1,2} Departamento I+D, Sediasa Alimentación S.A., Calle Tomás Edison, nº4. 28521, Rivas-Vaciamadrid (Madrid).

³ Departamento de Ingeniería de Alimentos, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48. 30203, Cartagena (Murcia).

*ireneperezlara@gmail.com

Abstract

In order to offer high quality products to consumers, it is intended to improve the healthy character of breaded meat products. It will be achieved through the reduction of its salt content, fat and oil absorption during frying process. In addition, its nutritional and nutraceutical value will be increased with the addition of ingredients which benefit the consumer's health. It will also include the improvement of the useful life and safety of these products with the application of new antioxidants and the use of work environments with low levels of contamination such as cleanrooms.

Keywords: Hydrocolloids; Fat substitutes; Flavor enhancers; Salt substitutes; Antioxidant oils vapors.

Resumen

Con el fin de ofrecer productos de alta calidad a los consumidores se pretende mejorar el carácter saludable de productos cárnicos empanados. Ello se conseguirá a través de la reducción de su contenido en sal, grasa y absorción de aceite durante el proceso de fritura. Además, se incrementará el valor nutricional y nutraceutico de los productos con la adición de ingredientes que beneficien la salud del consumidor. También se incluirá la mejora de la vida útil y seguridad de dichos productos con la aplicación de nuevos antioxidantes y el uso de ambientes de trabajo con niveles bajos de contaminación como es el caso de las salas blancas.

Palabras clave: Hidrocoloides; Sustitutos de grasa; Potenciadores de sabor; Sustitutos de sal; Vapores de aceites antioxidantes.

1. INTRODUCCIÓN

El tipo de dieta repercute en las enfermedades que padece la población. Las enfermedades no transmisibles causan la muerte a más de 40 millones de personas al año según la Organización Mundial de la Salud (OMS). Entre ellas se encuentran las enfermedades cardiovasculares, siendo la hipertensión arterial el factor de riesgo más importante. El consumo excesivo de sal está relacionado con dichas enfermedades, por ello, se establece la cantidad máxima diaria en 5 g de sal, lo que corresponde con 2 g de sodio.

Entre 2009 y 2012, la AECOSAN realizó una reducción del contenido de algunos productos como croquetas consiguiendo disminuir un 15% su contenido de sal [1].

Varios autores aseguran que la reducción de sal de forma gradual permite al consumidor acostumbrarse sin experimentar un sentimiento de rechazo. Uno de los estudios llevados a cabo logró reducir el contenido de sal gradualmente hasta un 21% a lo largo de 16 semanas [2]. Lo cierto es que la disminución de sal acarrea desventajas tecnológicas que influyen en la textura e intensidad de sabor de los productos, por ello el uso de sustitutos de sal ha sido estudiado por numerosos investigadores. Entre ellos el cloruro potásico es una de las sales que mejores resultados ofrece llegando a reducir hasta un 50% el contenido de cloruro sódico. Las sales cloradas aportan sabores metálicos que pueden ser enmascarados con aditivos que integran el grupo de potenciadores de sabor, como es el extracto de levadura o el glutamato monosódico [3].

Otro de los aspectos a mejorar en los productos empanados es su aporte de grasa. Para ello se ha estudiado el papel de sustitutos que aporten características similares en cuanto a textura como es el caso de la fibra. Varios autores respaldan la teoría de que la fibra tiene capacidad de retener el agua de los alimentos gracias a su estructura en forma de red. En un estudio llevado a cabo con carne picada se sustituyó un 2% de grasa con diferentes fibras. Como resultado, la inulina, la carboximetilcelulosa y la pectina obtuvieron la mejor puntuación sensorial [4].

La proporción de grasa de los productos empanados también puede ser disminuida reduciendo la absorción de aceite durante el proceso de fritura. La aplicación de hidrocoloides en la parte ligante que une el núcleo del producto con la corteza empanada ha sido objeto de estudio por la función aislante que proporciona. Se han estudiado diferentes recubrimientos comestibles derivados de la celulosa, como la carboximetilcelulosa, la metilcelulosa y la hidroxipropilmetilcelulosa, y otros recubrimientos a base de gomas como la goma xantana. Estos compuestos impiden la pérdida de humedad al mismo tiempo que evitan la absorción de aceite durante la deshidratación que tiene lugar en el proceso de fritura [5].

El uso de metilcelulosa ha permitido eliminar la etapa de pre-fritura que conforma el proceso de elaboración de productos empanados consiguiendo así una reducción de la absorción de aceite. Esto se debe a la capacidad de formación de gel de la metilcelulosa en presencia de agua a temperaturas próximas a los 80 °C. Este ensayo se realizó con anillas de calamar, las cuales sufrían un proceso de termogelación en agua. Una vez que el producto se freía para su consumo, mostraba un menor contenido de aceite en comparación con los productos que sí habían sido pre-fritos [6].

La adición de compuestos nutraceuticos a los productos que consumimos ha aumentado en los últimos años. Un claro ejemplo es el uso de cereales con motivo del alto contenido en fibra y almidón y, el uso de aceites omega-3 por los beneficios que aporta al sistema cardiovascular [7].

Para incrementar la vida útil de los productos se ha estudiado la aplicación de vapores de aceites antioxidantes en el envase de los productos. El aceite de pistacho al igual que el aceite de salvado de arroz es muy interesante gracias a su perfil antioxidante, el cual reside en el compuesto gamma oryzanol. La capacidad antioxidante viene dada por ácidos fenólicos como son los ácidos ferúlicos que integran el compuesto gamma oryzanol [8]. Un estudio determinó que el envasado activo con aceites esenciales retrasa el deterioro pos-cosecha en champiñones [9].

Los numerosos puntos críticos presentes en el proceso de fabricación de productos empanados hacen de especial interés el uso de condiciones ultralimpias durante su elaboración y envasado como hace referencia la Patente ES 2 534 529 B1.

Por último, la formación de acrilamida puede reducirse hasta un 50% con la aplicación de un baño con una solución de hidrocoloides a base de ácido algínico o pectina en una proporción de un 2% durante 1 hora. [10]

Los objetivos del presente trabajo se determinan a continuación:

1. Mejorar el carácter saludable de los productos cárnicos empanados refrigerados.
 - 1.1. Reducción del contenido en grasa y sal de los productos cárnicos empanados a través de la reformulación de los mismos.
 - 1.2. Reducción de la absorción de aceite durante la fritura.
 - 1.3. Incremento del valor nutricional y nutracéutico de los productos cárnicos empanados.
2. Mejora significativa de la vida útil de los productos cárnicos empanados, mediante la aplicación de nuevos antioxidantes durante su fabricación y/o envasado.
 - 2.1. Aplicación de antioxidantes en el ligante.
 - 2.2. Aplicación de vapores de aceites antioxidantes.
3. Mejora de la seguridad alimentaria de los productos cárnicos empanados, mediante el uso de nuevos sistemas de procesado y envasado ultralimpio.
 - 3.1. Estudio de la microbiología alterante y patógena de los productos cárnicos empanados.
 - 3.2. Uso de la tecnología de procesado y envasado en condiciones ultralimpias.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Mejora del carácter saludable de los productos cárnicos empanados refrigerados sin gluten.

En la tarea de reducción del contenido de grasa se incluirán fibras como la inulina y fructo-oligosacáridos que funcionen como sustitutos de grasa. Potenciadores del sabor y sales cloradas se adicionarán con el fin de reducir el contenido en sal.

En cuanto a la reducción de la absorción de aceite durante el proceso de fritura se desarrollarán diferentes soluciones de recubrimiento y empanado a base de harina de arroz blanco o integral y se adaptarán a los procesos tecnológicos industriales.

El incremento del valor nutricional y nutraceútico se llevará a cabo con la adición de ingredientes ricos en compuestos bioactivos y antioxidantes como verduras, legumbres, harina de arroz integral...que aporten fibra, compuestos fenólicos y otros compuestos como el gamma-oryzanol.

Los resultados obtenidos se analizarán y se validará la adaptación de los nuevos productos a los procesos industriales, prestando especial atención a la calidad gustativa y vida útil de las nuevas formulaciones de productos empanado refrigerado sin gluten.

2.2 Mejora significativa de la vida útil de los productos cárnicos empanados mediante la aplicación de nuevos antioxidantes durante su fabricación y/o envasado.

Los antioxidantes a objeto de estudio serán el aceite de salvado de arroz y el aceite de pistacho, los cuales se aplicarán tanto en el ligante como en el pan rallado.

Además, se estudiará el efecto de la inyección del aceite de arroz rico en gamma-oryzanol y el aceite de pistacho durante el envasado en atmósfera modificada.

Los ensayos se realizarán primero a escala de planta piloto para después adaptar los procesos de forma industrial.

Se estudiará la calidad gustativa y vida útil comparada de los productos empanados actuales y los nuevos desarrollos.

2.3 Mejora de la seguridad alimentaria de los productos cárnicos empanados mediante el uso de nuevos sistemas de procesado y envasado ultralimpio.

Se estudiará la microbiología patógena y alterante de los productos empanados diana y la procedencia u origen de los microorganismos en el proceso. También se estudiarán los beneficios de la tecnología de procesado y envasado en condiciones ultralimpias en la vida útil y seguridad de los productos empanados.

Los resultados se analizarán y se procederá a su validación a escala industrial asegurando el incremento de vida útil y seguridad alimentaria de los productos cárnicos empanados.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados esperados son productos cárnicos empanados refrigerados sin gluten más saludables, con mayor vida útil y más seguros para el consumidor.

4. REFERENCIAS

- [1] Ortega Anta R.M., López-Sobaler A.M., Aparicio Vizuet A., González Rodríguez L.G., Navia Lombán B., Perea Sánchez J.M., Marcos V., Rubio M.J., Santos Sanz S., Pérez Farinós N., Sanchidrán R., Teruel V., Dal Re Saavedra M.A. 2017. Encuesta Nacional de Consumo de Alimentos en Población Infantil y Adolescente (2012-2014). Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición.
- [2] Bobowski N., Rendahl A., Vickers Z. 2015. A longitudinal comparison of two salt reduction strategies: Acceptability of a low sodium food depends on the consumer. *Food. Qual. Prefer.* 40: 270-278.
- [3] Inguglia E.S., Zhang Z., Tiwari B.K., Kerry J.P., Burgess C.M. 2017. Salt reduction strategies in processed meat products – A review. *Trends Food Sci. Technol.* 59: 70-78.
- [4] Han M., Bertram H.C. 2017. Designing healthier comminuted meat products: Effect of dietary fibers on water distribution and texture of a fat-reduced meat model system. *Meat Sci.* 133: 159-165.
- [5] Kurek M., Ščetar M., Galić K. 2017. Edible coatings minimize fat uptake in deep fat fried products: A review. *Food Hydrocolloids.* 71: 225-235.
- [6] Salvador A., Sanz T., Fiszman S.M. 2008. Performance of methyl cellulose in coating batters for fried products. *Food Hydrocolloids.* 22: 1062-1067.
- [7] Schunck W-H., Konkel A., Fischer R., Weylandt K-H. 2018. Therapeutic potential of omega-3 fatty acid-derived epoxyeicosanoids in cardiovascular and inflammatory diseases. *Pharmacol. Ther.* 183: 177-204.
- [8] Massarolo K.C., Ribeiro A.C., Furlong E.B., Almeida de Souza Soares L. 2017. Effect of particle size of rice bran on gamma-oryzanol content and compounds. *J. Cereal Sci.* 75: 54-60.
- [9] Rivera Calo J., Crandall P.G., O'Bryan C.A., Ricke S.C. 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. *Food Control.* 54: 111-119.
- [10] Zeng X., Cheng K-W., Du Y., Kong R., Lo C., Chu I.K., Chen F., Wang M. 2010. Activities of hydrocolloids as inhibitors of acrylamide formation in model systems and fried potato strips. *Food Chem.* 121: 424-428.

Microbiological identification from foods of vegetable origin and the evolution during the processing

Identificación microbiológica a partir de alimentos de origen vegetal y su evolución durante el procesado

M. Clemente-Carazo^{1*}, P.S. Fernández¹, P.M. Periago¹

¹ Departamento de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena (ETSIA), Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena, Spain.

*martaclementecarazo@gmail.com

Abstract

Due to the evolution of the agri-food industry and its great advances, food safety is considered one of its main priorities. The need to ensure safety and preserve quality attributes (nutritional and sensory) have led to the need for increasingly sophisticated tools to produce food efficiently and in high quantities. This is a challenge to ensure microbiological stability by maintaining very standards of quality. The objective of this work has been through the use of the Polymerase Chain Reaction to rule out the presence of pathogenic microorganisms such as *Bacillus Cereus*.

Keywords: 16S; *Bacillus Spp.*; soups.

Resumen

Debido a la evolución de la industria agroalimentaria y a los grandes avances de ésta, la seguridad alimentaria se considera como una de las principales prioridades. La necesidad de garantizar seguridad y preservar los atributos de calidad (nutricionales y sensoriales) han derivado en la necesidad de contar con herramientas cada vez más sofisticadas para producir alimentos de manera eficiente y en elevadas cantidades. Ello supone un reto para garantizar la estabilidad microbiológica manteniendo estándares muy elevados de calidad. El objetivo de este trabajo ha sido a través del uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa descartar la presencia de microorganismos patógenos como es el caso de *Bacillus Cereus*.

Palabras clave: 16S; *Bacillus Spp.*; sopas.

1. INTRODUCCIÓN

El consumo de frutas y verduras se ha visto incrementado por el consumidor, debido a su gran potencial de compuestos antioxidantes, a lo largo de los últimos años [1].

Las industrias alimentarias han ido evolucionando a largo de los años, los estándares de seguridad y calidad alimentaria son los más importantes. Por lo que la industria alimentaria se ha visto obligada a realizar cambios importantes a nivel económico, que han hecho que no fuera tan fácil la puesta en marcha de equipos sofisticados, que hacen posible y fundamental la estabilidad microbiológica de los alimentos.

Es importante para el consumidor confiar en la inocuidad e integridad de los alimentos [2], así como también es de gran valor la adecuada manipulación del producto, en cada etapa, “del campo a la mesa” [3]. Por lo que es de vital importancia para la industria agroalimentaria conocer en cada momento, el producto que esté utilizando, en el caso del presente trabajo, productos de origen vegetal, el microorganismo al que se puede enfrentar, para que de esta manera se impida su aparición.

El objetivo de este trabajo es el siguiente: Identificar microorganismos aislados de productos de origen vegetal mediante técnicas moleculares (a partir de la secuenciación del ADN). Existen diferentes técnicas de identificación, pero las técnicas más fiables hoy en día son las moleculares. Estas son capaces a través de la secuenciación del ADN de averiguar qué microorganismo es al que nos estamos enfrentando. La más utilizada, es la Reacción en Cadena de la Polimerasa, más conocida como PCR.

Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia de interés, los productos de PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción ha tenido éxito, esta técnica se conoce como electroforesis [4].

El ARN ribosómico 16S es la macromolécula más conocida para estudios de filogenia y taxonomía bacteriana. Ha dado lugar al sistema de clasificación vigente, así como también a la identificación rápida y precisa de las bacterias. La amplificación del gen, para su posterior secuenciación, parte preferentemente de ADN extraído de un cultivo puro de la bacteria, aunque también puede utilizarse directamente de una muestra clínica. Esto último ha conducido al descubrimiento de nuevos agentes patógenos [5].

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Producto

Se adquirieron 10 envases (10 litros) de un producto a base de hortalizas de baja acidez, contenía patata y zanahoria.

2.2 Cultivo y aislamiento de colonias

Se inoculó 1 mL de la muestra de cada producto en una placa Petri y se vertió medio de cultivo de recuento de mesófilos totales, Plate Count Agar (PCA) (Scharlau Chemie SA, Barcelona, Spain). Las placas se incubaron en una estufa a 37°C durante 24 h. Con un asa de siembra estéril se cogieron colonias de cada placa Petri y se pusieron en un tubo de ensayo con 9 mL de medio líquido de caldo tripticasa de soja (TSB) (Scharlau Chemie SA, Barcelona, Spain) y se incubaron de nuevo a 37°C durante 24 h. De nuevo, con un asa de siembra se pasó del medio líquido a una placa de PCA, dejándolo incubar a 37°C durante 24 h para verificar su pureza. El medio líquido se llevó al Instituto de Biotecnología Vegetal (IBV) de la universidad Politécnica de Cartagena para realizar a las muestras la PCR.

2.3 Extracción y purificación del ADN

Tanto para la extracción como para la purificación del ADN se utilizaron dos Kit de Quiagen y se siguieron sus pertinentes protocolos, DNeasy PowerFood Microbial Kit y QUIAquick PCR Purification Kit respectivamente.

A continuación, se preparó una alícuota con los primers, reverse y forward y la enzima Taq polimerasa necesaria para la replicación del ADN molde. Y finalmente se cogieron 22 µL de la

mezcla anterior y 3 µL de cada muestra de ADN en eppendorf de PCR y se introdujeron en el termociclador programado para 40 ciclos.

Una vez finalizada la PCR se realizó la electroforesis para verificar que esta había funcionado y por tanto el ADN se había replicado.

3. RESULTADOS ESPERADOS

3.1 Evolución durante el procesado

Se ha comprobado que al ser un producto de baja acidez el número de colonias fue muy bajo durante los tres primeros días, pero conforme iba pasando el tiempo de incubación se observó un aumento del número de colonias en los 10L de producto. Esto probablemente sea debido al pH de este.

3.2. Secuenciación

Como se puede observar en la ilustración 2, el microorganismo pertenece al género de *Bacillus spp.* Si afinamos con la técnica del 16S podemos aproximarnos más a que género de *Bacillus* en concreto se refiere y observamos que hay una gran cantidad que se identifican con el microorganismo aislado al 99 %.

Ninguna de las cepas de *Bacillus* se considera patógena y el número de colonias en 1 mL demuestra es inferior a 1 UFC/100 mL en el producto de baja acidez por lo que no se considera riesgo alimentario.

Se han descrito casos que han provocado signos como vómitos asociados con niveles de *B. cereus* de 10³ UFC/g de alimento contaminado, se estima que la dosis infectiva mínima para ambos tipos de síndrome se encuentra aproximadamente entre 10⁵-10⁸ UFC/g de alimento consumido [6].

4. CONCLUSIONES

La técnica del 16S nos permite identificar al microorganismo que se ha aislado de la muestra en un corto plazo de tiempo de forma precisa, en este caso se ha identificado la especie del género *Bacillus* y descartar la presencia de *Bacillus cereus*, microorganismo patógeno.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos al departamento de Ingeniería de los Alimentos y del Equipamiento Agrícola por toda la ayuda prestada.

6. REFERENCIAS

[1] Motilva, M.-J., Macià, A., Romero, M.-P., Labrador, A., Domínguez, A., Peiró, L. 2014. Optimisation and validation of analytical methods for the simultaneous extraction of antioxidants: Application to the analysis of tomato sauces. Food Chem. 163: 234–243. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.096>

[2] OMS, F. 2003. Garantía de la inocuidad y calidad de los alimentos: directrices para el fortalecimiento de los sistemas nacionales de control de los alimentos.

[3]Beuchat, L.R. 1998. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw. Food Safety Unit. WHO. Report WHO/FSF/FOS/98.2.

[4] Tamay de Dios, L., Ibarra, C., Velasquillo, C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Medigraphic. 2: 70-78.

[5] Rodicio, M.R., Mendoza, M.C. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica 22: 238-245.

[6] Ward, P., Roy, D. 2005. Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. Le Lait 85: 23-32.

Effect of a new rich in bioactive compounds beverage for energetic metabolism modulation in overweight adults Efecto de una nueva bebida rica en compuestos bioactivos para modular el metabolismo energético en adultos con sobrepeso

V. Agulló^{1*}, C. García-Viguera¹

¹Laboratorio de Fitoquímica y Alimentos Saludables, Dpto Ciencia y Tecnología de Alimentos, CEBAS-CSIC. Campus Universitario de Espinardo 25, Murcia.

*vicenteagullo@gmail.com

Abstract

In recent decades, a positive relationship has been demonstrated between the consumption of sugary drinks and the risk of obesity, diabetes and cardiovascular diseases. To reduce the sugar content of foods while maintaining a pleasant taste, new options have been proposed using sweeteners, although it is questioned whether these additives contribute to a higher caloric intake or if they produce negative long-term effects. In addition, to promote the consumption of fruits and vegetables, new formulations that increase the shelf life of fresh fruits, preserve nutrients and reduce the energy content of fruit juices are being developed. The research will begin with the development of citrus-based and maqui-based beverages, rich in bioactive (poly) phenolic compounds, which include different non-nutritive sweeteners, both natural (stevia) and artificial (sucralose). The project will cover everything from food technological development to nutrition and disease prevention. The effects of these drinks on the underlying mechanisms in postprandial hyperglycemia will be analyzed and metabolites in circulation will be determined responsible for the observed evidence by intervention studies with healthy overweight volunteers.

Keywords: Juice; Bioavailability; Biomarker; Sweetener.

Resumen

En las últimas décadas se ha demostrado una relación positiva entre el consumo de bebidas azucaradas y el riesgo de obesidad, diabetes y enfermedades cardiovasculares. Para reducir el contenido en azúcares de los alimentos manteniendo un sabor agradable, se han propuesto nuevas opciones usando edulcorantes, aunque se cuestiona si dichos aditivos contribuyen a una mayor ingesta calórica o si producen efectos negativos a largo plazo. Además, para fomentar el consumo de frutas y hortalizas se están desarrollando nuevas formulaciones que aumenten la vida útil de las frutas frescas, preserven los nutrientes y reduzcan el contenido energético de los zumos de frutas. La investigación comenzará con el desarrollo de bebidas a base cítricos y maqui, ricas en compuestos bioactivos (poli) fenólicos, que incluyan diferentes edulcorantes no nutritivos tanto de tipo natural (stevia) como artificial (sucralosa). El proyecto abarcará desde el desarrollo tecnológico alimentario hasta la nutrición y prevención de enfermedades ya que, realizando estudios de intervención con voluntarios sanos con sobrepeso, se analizarán los efectos de estas bebidas en los mecanismos subyacentes en la hiperglicemia postprandial y se determinarán los metabolitos en circulación responsables de la evidencia observada.

Palabras clave: Zumo; Biodisponibilidad; Biomarcador; Edulcorante.

1. INTRODUCCIÓN

Grandes estudios epidemiológicos han demostrado una relación positiva entre el consumo de bebidas azucaradas y el riesgo de obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares y el síndrome metabólico [1, 2]. Este tipo de bebidas, elaboradas generalmente con sacarosa y jarabe de fructosa, son fuentes de azúcares rápidamente absorbibles que producen un aumento rápido en plasma de la glucosa y la insulina tras su ingesta, lo que contribuye a producir resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa.

Paralelamente a la búsqueda de alternativas saludables al alto consumo de bebidas azucaradas, existe una necesidad importante de aumentar el consumo de frutas y verduras en la población y desarrollar nuevas formulaciones que aumenten la vida útil de las frutas frescas, preserven los nutrientes o reduzcan el contenido energético de los zumos de frutas. En este sentido, el limón, con su agradable aroma y su alto valor nutritivo es una apuesta importante en la elaboración de bebidas no alcohólicas. Otro ingrediente novedoso y de atractivas propiedades es el maqui (*Aristotelia chilensis*), una fuente natural especialmente rica en antocianos (derivados de cianidina y delfinidina) y también contiene ácidos hidroxicinámicos (clorogénico) [3]. Se ha observado que los antocianos mejoran la hiperglicemia y la sensibilidad a la insulina vía activación de rutas de señalización celular [4].

Con el fin de reducir el contenido en azúcares hay una tendencia a buscar otras opciones a través de edulcorantes añadidos, aunque existe cierta polémica en relación a ellos ya que parece ser que contribuyen a una mayor ingesta calórica y a la obesidad [5]. Por ello emplearemos edulcorantes de tipo natural (stevia) y artificial (sucralosa), en comparación con una bebida tradicionalmente elaborada con fructosa/sacarosa.

Por lo tanto, el objetivo principal del presente proyecto es estudiar la influencia de diversos edulcorantes, empleados en la elaboración de una nueva bebida, rica en compuestos bioactivos (polifenoles y vitaminas), en el metabolismo energético de adultos con sobrepeso, así como determinar cuáles son los posibles metabolitos en circulación responsables de la evidencia observada, evaluando su bioaccesibilidad y biodisponibilidad.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Formulación de la bebida

Se elaborará una bebida funcional que incluya limón y bayas de maqui (*Aristotelia chilensis*), que proporcione un valor añadido en base a su contenido en compuestos polifenólicos, principalmente flavanonas y flavonas (limón) y antocianos (maqui). La bebida se desarrollará a escala de laboratorio en el CEBAS-CSIC y escala semi-industrial en la planta piloto disponible en la Universidad Miguel Hernández de Elche, con la ayuda del equipo de trabajo, de la misma.

Sobre las mezclas realizadas se elaborarán distintas bebidas adicionando los endulzantes objeto de estudio: fructosa/sacarosa (nutritivo, comúnmente empleado), sucralosa (no nutritivo artificial) y stevia (no nutritivo natural).

La cantidad de endulzante a adicionar se establecerá realizando ensayos de estabilidad de producto y de calidad organoléptica (panel de catadores CEBAS y UMH), de acuerdo con la legislación europea y española y reglamentos técnico-sanitarios que recogen los máximos niveles permitidos para su uso como ingredientes o aditivos en bebidas no alcohólicas.

2.2 Evaluación de la calidad nutricional, seguridad microbiológica y potencial actividad biológica de las bebidas

Las mezclas obtenidas se almacenarán en viales con atmósfera de nitrógeno tras eliminar el aire, a temperatura ambiente en oscuridad a 4° C y a 25° C durante 60 días. Se llevarán a cabo

diversos análisis cada 7 días durante los primeros 21 días y cada 15 días durante el resto del experimento, por los equipos de investigación y trabajo del CEBAS-CSIC y UPCT (Unidad Asociada).

Como índices de calidad de las bebidas se evaluará el pH, la acidez valorable (AV) y los sólidos solubles totales (SST) [6]. Estos factores pueden servir para establecer el marco en el que se producen los distintos cambios fisicoquímicos que se llevan a cabo como consecuencia del almacenamiento.

Se determinará el contenido de ácido ascórbico (AA) y dehidroascórbico (DHAA) siguiendo protocolos previos de González-Molina y col. [7], empleando un sistema HPLC-UV (Merck). Se llevará a cabo la caracterización fitoquímica de las bebidas diseñadas mediante técnicas de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas HPLC-DAD-ESI/MS [3]. Se realizará la medida de color como parámetro de calidad organoléptica, mediante el sistema C.I.E.L*a*b* (Comision Internationale de l'Eclairage), midiendo características de luminosidad, tono e intensidad de color.

El análisis de las propiedades biológicas antioxidantes y sobre enzimas del metabolismo lipídico y glucídico contribuirá a establecer el posible potencial beneficioso de las bebidas en la población adulta en sobrepeso. La capacidad antioxidante se determinará mediante los métodos DPPH y ORAC [8, 9].

La evaluación de la seguridad alimentaria de las bebidas se llevará a cabo mediante las determinaciones microbiológicas de ausencia de patógenos.

2.3 Escalado de la producción de bebidas a nivel piloto o preindustrial y estudios de vida útil durante almacenamiento

Una vez seleccionadas las mezclas más adecuadas para los tres tipos de bebida (con fructosa/sacarosa control negativo, sucralosa o stevia), se realizará el escalado de las bebidas a nivel preindustrial para poder suministrar a los voluntarios las raciones diarias de bebidas durante el tiempo que duren los estudios de intervención. Este proceso se realizará en la Planta Piloto de la UMH en colaboración con CEBAS-CSIC.

Se llevará a cabo un análisis de la calidad nutricional de las bebidas desarrolladas, incluyendo la acidez titulable, pH y sólidos solubles totales que se medirán como índices de calidad de las bebidas, igual al realizado a escala laboratorio. Igualmente se medirán las alteraciones del color para asegurar su calidad organoléptica. Se realizarán estudios de vida útil de las bebidas a escala piloto durante 70 días [6].

2.4 Estudios de intervención en agudo y crónico en adultos con sobrepeso

Se pondrá a punto el método de determinación de marcadores de ingesta provenientes de antocianos y otros compuestos fenólicos para evaluarlos efectos bilógicos de las bebidas basado en la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

Una vez seleccionados los voluntarios se llevará a cabo la toma de muestras de orina y sangre a diferentes tiempos antes y después del consumo de la bebida y durante diferentes periodos de tiempo según el tipo de intervención.

Con las muestras de orina y plasma se estimará la influencia de los diversos ingredientes endulzantes empleados en la biodisponibilidad, usando marcadores de ingesta (metabolitos generados a partir de los compuestos polifenólicos ingeridos) y marcadores de respuesta (marcadores de procesos inflamatorios, de estrés oxidativo, homeostasis glicémica y lipídica y marcadores de respuesta hormonal).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez realizados todos los análisis anteriormente comentados se espera obtener una bebida segura, con una aceptabilidad organoléptica elevada a la par que nutritiva y un alto poder antioxidante, que pueda reemplazar a las bebidas con azúcares añadidos gracias a sus efectos beneficiosos en la prevención de la hiperglicemia postprandial. Además, se espera obtener resultados concluyentes respecto a la interacción de la bebida con las principales rutas implicadas en el control del metabolismo lipídico y glicémico, el estrés oxidativo e inflamatorio y la regulación hormonal en población adulta en sobrepeso.

4. CONCLUSIONES

Las posibles conclusiones, que se esperan obtener, estarán relacionadas con la identificación de marcadores de ingesta de compuestos polifenólicos, los efectos reales de los diferentes edulcorantes sobre el metabolismo de la inflamación, así como la formulación de un zumo con efectos beneficiosos para la salud.

5. AGRADECIMIENTOS

Colaboración y asesoramiento técnico a escala semi-industrial de la Dra Martí (UMH) y financiación del proyecto coordinado AGL2016-75332-C2-1-R y AGL2016-75332-C2-2.

6. REFERENCIAS

- [1] Hu, F.B., V.S. Malik, 2010. Sugar-sweetened beverages and risk of obesity and type 2 diabetes: epidemiologic evidence. *Physiol. Behav.* 100: 47-54.
- [2] Popkin B.M., 2012. Sugary beverages represent a threat to global health. *Trends Endocrinol. Metab.* 23(12):591-303.
- [3] Gironés-Vilaplana A., Baenas N., Villaño D., Speisky H., Garcia-Viguera C., Moreno D.A. 2014. Evaluation of Latin-American fruits rich in phytochemicals with biological effects. *J Func Foods.* 7: 599-608.
- [4] Hanhineva K., Törrönen R., Bondia-Pons I., Pekkinen J., Kolehmainen M., Mykkänen H., Poutanen K., 2010. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* 11(4): 1365-1402.
- [5] Suez J., Korem T., Zeevi D., Zilberman-Schapira G., Thaiss C.A., Maza O., Israeli D., Zmora N., Gilad S., Weinberger A., Kuperman Y., Harmelin A., Kolodkin-Gal I., Shapiro H., Halpern Z., Segal E., Elinav E., 2014. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature.* 514(7521): 181-186.
- [6] Mena P., Martí N., Saura D., Valero M., García-Viguera C. 2013. Combinatory effect of thermal treatment and blending on the quality of pomegranate juices. *Food Bioproc. Tech.* 6: 3186-3199.
- [7] Gonzalez-Molina E., Domínguez-Perles R., Moreno D. A., García-Viguera C. 2010. Natural bioactive compounds of Citrus limon for food and health. *NJ Pharm. Biomed. Anal.* 51: 327-345.
- [8] Villaño D., Fernandez-Pachon M.S., Moya, M.L. 2007. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta.* 71(1): 230-245.
- [9] Ou B., Hampsch-Woodill M., Prior R.L. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 49(10): 4619-4626.

Innovation in the information of labeling and food packaging as a tool of the circular economy.

Innovación en la información del etiquetado y envasado de alimentos como herramienta de la Economía Circular

J.M. Donate*, M.D. de Miguel

Departamento de la Economía de la Empresa. ETSIA. Universidad Politécnica de Cartagena.

*chemadonate@gmail.com

Abstract

The World Food Market covered by FAO [1] has set new sustainability objectives, this institution aims to ensure Food Safety regulated by countries, in Europe by the European Food Safety Authority (EFSA) and in the United States by the Food and Drugs Administration (FDA). These regulations imply, on the one hand, a commitment by the food industry to ensure certain foods, which are destined for different types of population segmented by age, sex, religion, intolerance to different components or nutrients present in many food products. On the other hand, the consumer has the right of access to the information of the food he is consuming, demanding sustainable production from the food industry, as an important factor in the Circular Economy [2].

Keywords: Trust; consumer; re-use design; new technologies.

Resumen

El Mercado Mundial de alimentos amparado por la FAO [1], ha planteado nuevos objetivos de sostenibilidad, esta institución pretende garantizar la Seguridad Alimentaria regulado por los países, en Europa por la European Food Safety Authority (EFSA) y en Estados Unidos por la Food and and Drugs Administration (FDA). Estas regulaciones implican, por una parte, un compromiso de la industria alimentaria de asegurar unos alimentos, que van destinados a distintos tipos de población segmentados por edad, sexo, religión, intolerancia a distintos componentes o nutrientes presentes en muchos alimentos. Por otra parte, el consumidor tiene el derecho de acceso a la información de los alimentos que está consumiendo, exigiendo la producción sostenible a la industria alimentaria, como factor importante en la Economía Circular [2].

Palabras clave: Confianza; consumidor; reutilización. diseño; nuevas tecnologías.

1. INTRODUCCIÓN

Ya en la década de los cuarenta, del siglo pasado Schumpeter [3], entendió la innovación como una de las causas del desarrollo económico y como un proceso de transformación económica, social y cultural, la definió como: “la introducción de nuevos bienes y servicios en el mercado, el surgimiento de nuevos métodos de producción y transporte, la consecución de la apertura de un nuevo mercado, la generación de una nueva fuente de oferta de materias primas y el cambio en la organización en su proceso de gestión”. Dicho autor ha considerado que la innovación radical es la más importante, por su carácter de inductor de cambios y de transformaciones, y genera aportaciones novedosas y totalmente diferentes en la sociedad y en la economía, a pesar de las altas inversiones y el mayor riesgo que ello supone [4].

Más recientemente Damanpour y Gopalakrishnan [5] han resaltado dentro del concepto de innovaciones radicales: a) a las innovaciones tecnológicas de producto, innovaciones producidas por cambios en el diseño, en la propia fabricación, en la fase de comercialización, b) a las innovaciones tecnológicas de proceso, generada por la implementación de nuevos procesos de producción o modificaciones a los ya existentes con la finalidad de mejorar la eficiencia, ya sea con la incorporación de nuevas materias primas, o nuevos métodos de trabajo, c) a las innovaciones en sistemas de gestión, que responden a aquellas innovaciones que se hacen a la estructura de la organización y al proceso administrativo [4].

Por otro lado, en la actualidad debido a un incremento de la población y su alto consumo de alimentos, se está generando elevados porcentajes de residuos derivados del proceso de elaboración y consumo [6]. Para la consideración de esta problemática, se va a abordar el concepto novedoso de la denominada ‘Economía Circular’: que pretende abandonar la economía lineal basada en producir, usar y tirar, y dar paso a una economía donde los recursos transformados en productos y finalmente en residuos, no sean desechados sin más, sino considerados insumos para fabricar nuevos productos, reintroduciéndose así en el ciclo productivo. Este paradigma se persigue en la ‘Economía Circular’, que es un concepto que definitivamente parece que ha venido para quedarse, gracias al gran impulso dado desde la propia Unión Europea [7].

El Etiquetado de alimentos es la principal vía de comunicación entre la Industria de Alimentos y el consumidor final. Con ello el consumidor obtiene información relacionada con el producto que está consumiendo o adquiriendo en su proceso de compra. El Etiquetado y envasado está regido por unas Normas Derecho Alimentario [8], con adaptaciones en cada país, en el caso de España son las siguientes:

- Ley 17/2011, de 5 de julio, de seguridad alimentaria y nutrición.
- Real Decreto 126/2015, de 27 de febrero.
- Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio.
- Real Decreto 1808/1991, de 13 de Diciembre, (B.O.E. 25.12.1991).

A nivel Europeo las normativas dictadas por la Unión Europea son las siguientes:

- Reglamento (UE) Nº 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) Nº 1924/2006 y (CE) Nº 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 90/496/CEE del Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE, y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) Nº 608/2004 de la Comisión Texto pertinente a efectos del EEE.

Dentro de la Unión Europa es la European Food Safety Authority (EFSA) es el organismo competente de la Seguridad Alimentaria. Fuera de la Unión Europea es la Food and Drugs Administration (FDA) el organismo responsable en Estados Unidos, siendo este uno de los Mercados internacionales más importantes.

Regulaciones en Estados Unidos

Regulaciones:

- 21 CFR 101. Code of Federal Regulations Title 21.
- 9 CFR 317. LABELING, MARKING DEVICES, AND CONTAINERS.
- 9 CFR 381. POULTRY PRODUCTS INSPECTION REGULATIONS.

La actualización, en Diciembre de 2014, en materia de etiquetado de los alimentos, del Reglamento (UE) nº 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011

sobre la información alimentaria facilitada al consumidor, ha refundido toda la normativa en materia de etiquetado, tanto con los aspectos generales, como los nutricionales (Directiva 2000/13/CE y Directiva 90/496/CEE). Era más que necesaria una actualización de esta legislación.

Las mejoras van encaminadas en:

- 1) Información nutricional obligatoria, para la mayoría de los alimentos transformados.
- 2) Mejor legibilidad de los etiquetados, que debe ser claro y legible.
- 3) País de origen de los productos, la obligatoriedad de indicar el país de origen en el etiquetado.
- 4) Los ingredientes mayoritarios, alérgenos, aceites y grasas vegetales y sustancias como los nano-materiales, entre otros aspectos.

Se observa que la información actual no es suficiente y el consumidor no se siente respaldado por la industria alimentaria, que muchas veces no le proporciona una información veraz de ese alimento que está consumiendo, distribuyéndose en diferentes estamentos de la población, clasificados por edad, sexo, religión, personas con distintas disfunciones alimentarias, ya sea por enfermedad, o por intolerancias a ciertos alimentos.

Nos encontramos ante un nuevo paradigma mundial, que es abastecer a la población alimentos con la mayor información posible en cuanto al etiquetado se refiere, teniendo en cuenta el más importante factor que es la salud humana, evitando los fraudes alimentarios y la importancia de consumir raciones saludables, consumiendo menos para alimentarse mejor, aportando una herramienta imprescindible para la economía Circular [9].

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología del estudio consiste en la revisión de los productos producidos por las empresas Agroalimentarias españolas y Europeas, para afrontar la obtención de datos que se utilizará un diseño de encuesta online dirigido a gerentes de empresas agroalimentarias.

Se analizará el grado de cumplimiento de la Normativa que regula el etiquetado, a través de una muestra representativa elegida al azar de los principales productos alimentarios que configuran la cesta de la compra de un ciudadano europeo de clase social media.

Determinar el grado de sostenibilidad del envasado de los productos agroalimentario a través de un muestreo prospectivo de los diferentes tipos de envasado, y ver su capacidad de reutilización para incorporarlo al concepto de economía circular.

La información del consumidor se obtendrá a través de una encuesta en la que se recogerá su aptitud hacia determinados productos, preferencias y opiniones sobre envasado, etiquetado, reciclaje y Economía Circular.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 22.977 empresas del sector de alimentación que están censadas en la base de datos SABI, solo 2.775 son empresas con proyección internacional. En este tipo de empresas exportadoras/ importadoras, es el que se va a centrar el estudio.

Se está diseñando una encuesta que se lanzará por correo electrónico a todas las empresas antes mencionadas y se tratará de detectar el grado de cumplimiento de las normativas y el estado de la innovación en sus etiquetas y envasado. Para que la información recoja la opinión de todas las partes interesadas, es decir de los stakeholders, se recabará, también, la opinión de los

consumidores mayores de 18 años, en una muestra de unos 100 individuos, completando la toma de información con la entrevista a unos/as 30 Directivos/as de empresas, relacionándolos con los productos que constituyen la cesta de la compra.

Los instrumentos metodológicos estarán basados en un cuestionario socio-demográfico, y se aplicará el diagrama de Porter, con adaptación de la escala anterior para los propósitos de esta investigación.

El tratamiento y análisis estadístico constará de un estudio piloto del que previamente se realizará un análisis descriptivo y factorial exploratorio.

Al no haber procedido a realizar toma de datos vía encuesta, no procede analizar los resultados e incluirlos en este apartado.

4. CONCLUSIONES

Se pretende conseguir que el etiquetado sea un elemento más dinámico, más informativo y más completo para el consumidor final y por otro lado que el envasado de los productos agroalimentarios puedan ser reutilizados en un sistema productivo.

5. AGRADECIMIENTOS

El doctorando desea manifestar un más sincero agradecimiento a todas aquellas empresas que han ayuda en esta investigación, rellenando la encuesta enviada, lo que es una colaboración muy importante.

6. REFERENCIAS

- [1] FAO. 2017. Informe Global sobre crisis alimentarias de 2018. Food Security Information Network. Fecha de consulta: 22 de Marzo de 2018. Disponible en : <http://www.fao.org>
- [2] COM. 2017. Sobre la aplicación del plan de acción para la economía circular. Informe de la Comisión al Parlamento Europeo, al Consejo, al Comité Económico y Social Europeo y al Comité de las Regiones.
- [3] Schumpeter J.A. 1978. Teoría del desenvolvimiento económico (5ª ed.) editorial: Fondo de cultura económica de España. México ISBN: 9789681650698
- [4] Ángel Álvarez, B.E. 2009. El concepto de innovación. Rev. Lupa empresarial. Revista Online. Business School. CEIPA. (Consultada en el 20 de marzo de 2018 [<https://www.ceipa.edu.co/lupa/index.php/lupa/issue/view/22>])
- [5] Damanpour F., Gopalakrishnan S. 2001. The dynamics of the adoption of product and process innovations in Organizations. Journal of management studies Vol (38) 0022-2380 doi.org/10.1111/1467-6486.00227
- [6] Mohd A., Norhidayah S. 2018. Eleven shades of food integrity: A halal supply chain perspective. *Trends in Food Science & Technology*, vol 71: 216-224, ISSN 0924-2244.
- [7] COM. 2015. Cerrar el Círculo: un plan de acciones de la UE para la economía circular. Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo, al Consejo, al Comité Económico y Social Europeo y al Comité de las Regiones.
- [8] Przyrembel H. 2004. Food labeling legislation in the EU and consumers information. *Trends in Food Science & Technology*, vol 15: 360-365.
- [9] Prieto-Sandoval V., Jaca C., Ormazabal M. 2018. Towards a consensus on the circular economy. *Journal of Cleaner Production*, vol 179: 605-615. ISSN 0959-6526.

Development of an antimicrobial active cardboard packaging including encapsulated natural antimicrobial agents, for bulk packaging of fresh tomatoes and peppers. Desarrollo de un envase de cartón activo antimicrobiano que incluye agentes antimicrobianos naturales encapsulados, para el envasado a granel de tomates y pimientos frescos.

L. Buendía-Moreno^{1*}, S. Soto-Jover¹, A. López-Gómez¹

¹Food Engineering and Agricultural Equipment Department, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, 30203 Cartagena, Spain.

*laura.buendia.moreno@gmail.com

Abstract

In the last years the production of active packaging has increased for the conservation of vegetable products, as fresh fruits and vegetables, by the purpose of extending its shelf-life. In this work the use of encapsulated essential oils has been studied, due to its antimicrobial effect, in the manufacturing of active packaging to be applied in conservation of fresh tomatoes and peppers. The essential oils, encapsulated in β -cyclodextrins (β -CD), are dissolved in a coating emulsion applied to the surface of the cardboard in contact with the packaged product. The microorganisms altering fresh tomato and pepper will be determined and isolated, and different combinations of encapsulated essential oils will be selected and tested according to its effective antimicrobial effect on typical microbiology of this kind of horticultural products.

Keywords: β -Cyclodextrins; essential oils; alteration microbiology; horticultural products.

Resumen

En los últimos años se ha incrementado la elaboración de envases activos para la conservación de productos vegetales, como frutas y hortalizas frescas enteras, con la finalidad de alargar su vida útil. En este trabajo se ha estudiado el uso de aceites esenciales, debido a su efecto antimicrobiano, en la elaboración de envases activos para la conservación de tomates frescos. Los aceites esenciales, encapsulados en β -ciclodextrinas (β -CD), se disuelven en un recubrimiento impermeabilizante que se aplica sobre la superficie del cartón en contacto con el producto envasado. Para ello se determinarán y aislarán los microorganismos alterantes del tomate y pimiento, frescos, y se seleccionarán y ensayarán distintas combinaciones de aceites esenciales aplicados como recubrimiento del envase activo que sean eficaces frente a la microbiología típica de este tipo de productos hortofrutícolas.

Palabras clave: β -Ciclodextrinas; aceites esenciales; microbiología alterante; productos hortofrutícolas.

1. INTRODUCCIÓN

Las principales funciones de los envases para alimentos son las de protección, comunicación, contención y seguridad durante el transporte. Además, otras funciones se han ido incorporando para sectores específicos de consumidores que demandan productos mínimamente procesados y con menores cantidades de conservantes [1]. En los últimos años, la innovación en envases para alimentos se ha encaminado hacia el desarrollo de nuevas tecnologías que aporten un beneficio adicional, y una de estas nuevas tecnologías son los envases activos.

Un envase activo está definido como un sistema que interactúa con el producto extendiendo su vida útil, así como manteniendo su calidad nutricional y microbiológica intentando mejorar la seguridad y sus características sensoriales [2]. Dentro de los envases activos se encuentra clasificado un tipo de envase que incorpora agentes antimicrobianos para evitar el desarrollo indeseable de microorganismos sobre la superficie del alimento, y estos son conocidos como envases antimicrobianos [3].

El uso de los aceites esenciales (AEs) como agentes antimicrobianos se ha convertido en una de las áreas de investigación más importantes con la finalidad de sustituir los conservantes sintéticos por otros naturales. Los AEs son sustancias que se obtienen de distintas plantas y especias, y muchos de ellos son considerados como GRAS (“Generalmente Reconocidos como Seguros”) [4], pero su uso en la industria alimentaria, como aditivo, está limitado principalmente por las alteraciones que pueden causar en los atributos sensoriales de los alimentos. Con el fin de reducir este efecto, se propone el uso de bajas concentraciones de AEs o la utilización de estos aceites en fase de vapor [5, 6, 7].

Los AEs se encapsulan para que su liberación en forma de vapor se produzca de manera gradual, y pasen al alimento, dando lugar a productos con mejores características, además de protegerlos frente a reacciones de oxidación debido a la luz o al oxígeno [6]. Los primeros métodos de encapsulación se desarrollaron entre los años 1930 y 1940, cuya evolución ha llevado al desarrollo de numerosos métodos de encapsulación entre los que se encuentran los que forman complejos de inclusión, también conocidos como encapsulación molecular que usa ciclodextrinas para la encapsulación de estos aceites, formando complejos de inclusión [8]. Las α - y β -ciclodextrinas han sido aprobadas como aditivos por la Unión Europea, y han sido incluidas en las listas europeas de aditivos autorizados para su uso alimentario con los números E-457 y E-459 [9].

En este trabajo se pretende estudiar la combinación más adecuada de AEs encapsulados, aplicados en el recubrimiento del cartón, para dificultar el crecimiento de la flora microbiana alterante en los productos hortofrutícolas tomates y pimientos frescos. Se trata de mejorar la calidad y la vida útil de estos productos comercializados a granel, disminuyendo las pérdidas por podredumbre durante su transporte y distribución.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Estudio *in vitro*.

En primer lugar, se realizará una selección de la mejor combinación y dosis de AEs capaces de inhibir o retardar el crecimiento de los microorganismos alterantes típicos en productos hortofrutícolas, como tomates y pimientos. La microbiología estudiada será: fúngica (*Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea*) y patógena (*Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*).

Para ello se introducirán en placa, con medio previamente inoculado con distintos microorganismos, discos de papel de filtro de un diámetro determinado previamente autoclavados, donde se añadirá diferentes concentraciones de aceite esencial en forma líquida en mg de aceite/m². De tal manera que los vapores generados por los AEs entren en contacto con el

microorganismo, y consecuentemente generen zonas de inhibición. Seguidamente se incubará a la temperatura adecuada del microorganismo en estudio y se evaluará la actividad antimicrobiana de los AEs.

2.2 Encapsulación de los aceites esenciales en β -ciclodextrinas.

La encapsulación de los AEs se realizará mediante una mezcla directa equimolar (1:1) entre el aceite esencial y las β -ciclodextrinas, formando un complejo de inclusión en el que los AEs se encuentran encapsulados en el interior de las β -ciclodextrinas. Antes de la encapsulación, las β -ciclodextrinas se introducirán en una estufa a 100°C durante 1 h para eliminar la humedad y la carga microbiana banal. La mezcla con el aceite esencial y la β -ciclodextrina, se realizará en una campana de flujo laminar modelo Telstar Bio II A/M (Terrasa, Spain), hasta obtener un polvo homogéneo y sin aglomerados. El complejo de inclusión se mantendrá a temperatura ambiente en un frasco de vidrio opaco sellado con parafilm hasta su aplicación. Las β -ciclodextrinas que se van a utilizar son del tipo Kleptose a un 10% de humedad (Roquette, Lestrem, Francia).

2.3 Actividad antimicrobiana in vitro del cartón activo.

Tras determinar las mejores combinaciones y dosis de AEs, se realizará la evaluación de la actividad antimicrobiana del cartón activo. Los ensayos se realizarán empleando placas Petri de 90 mm, donde se introducirán discos de cartón de diámetro 85 mm y con una superficie total de 56.75 cm². Todos los discos de cartón serán previamente autoclavados. Además se usarán aros metálicos estériles que se colocarán sobre el cartón activo, para evitar que éste entre en contacto directo con el agar inoculado.

Los AEs encapsulados se mezclarán previamente con una emulsión acuosa poliacrílica del tipo UKAPHOB 530 (de Schill+Seilacher, Böbligen, Alemania), aprobada por la legislación europea (Reglamento CE n°1935/2004) para entrar en contacto con alimentos. Esta emulsión poliacrílica se aplica como recubrimiento impermeabilizante del cartón.

Una vez mezclada y homogeneizada esta emulsión será distribuida por toda la superficie del cartón, se colocarán sobre la tapa de la placa Petri en la que el aceite esencial se liberará en el volumen de aire disponible entre el agar y el cartón.

2.4 Determinación de la microbiología superficial y porcentaje de podridos en tomate y pimiento durante el almacenamiento en cajas de cartón activo.

Se realizará un análisis microbiológico de microorganismos aerobios mesófilos totales, enterobacterias, psicrófilos, mohos y levaduras en muestras de tomate y pimientos frescos almacenados a 8°C y a una humedad relativa del 85%.

Para la determinación del porcentaje de podridos, el producto será envasado en dos tipos de cajas diferentes recubiertas con un film de ácido poliláctico:

- Control. Cajas de cartón normal.
- Envasado 1. Cajas de cartón activo.

Periódicamente se harán análisis microbiológico y recuento de podridos, de cada una de las cajas, para posteriormente calcular su porcentaje y ver si los AEs encapsulados actúan como antimicrobianos.

3. RESULTADOS ESPERADOS

Se pretende estudiar el uso de determinadas combinaciones de aceites esenciales encapsulados en β -ciclodextrinas formando complejos de inclusión, en combinación con una emulsión acuosa, aplicada como recubrimiento activo en cajas de cartón que puede dar lugar a una disminución significativa de la microbiología alterante de la superficie de los tomates y pimientos refrigerados envasados en este tipo de envases activos.

4. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del proyecto aprobado por la Consejería de Desarrollo Económico, Turismo y Empleo de la Región de Murcia, con la convocatoria RIS3-Mur de agosto de 2016 y con expediente de aprobación nº2/16SAE00006. La empresa participante en el desarrollo de este proyecto es S.A.E de Cartón Ondulado de Molina de Segura (Murcia) que financia la realización de estas investigaciones y la beca otorgada a Laura Buendía para la realización de su tesis doctoral.

5. REFERENCIAS

- [1] Sun Lee D., Yam K.T., Piergiovanni L. 2008. Packag. Technol. Sci. CRC Press. Boca Raton, EE.UU, 650 p.
- [2] Ozdemir M., Floros J. D. 2010. Sci. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. Packag. Technol. 44(3): 185-193.
- [3] Vermeiren L., Devlieghere F., Debevere J. 2002. Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. Food Addit. Contam. 19: 163-171.
- [4] Ávila-Sosa R., Palou E., Jiménez M.T., Nevárez-Moorillón G.V., Navarro A.R., López-Malo A. 2012. Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. Int. J. Food Microbiol. 153 (1-2): 66-72.
- [5] López-Malo A., Palou E., León-Cruz R., Alzamora S. 2005. Mixtures of natural and synthetic antifungal agents. Adv. Microbial Ecol. 571 (4): 261-286.
- [6] Cevallos P.A.P., Buera M.P., Elizalde B.E. 2010. Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in betacyclodextrin: effect of interaction with water on complex stability. J. Food Eng. 35: 70-75.
- [7] Dorman H.J.D., Deans S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol. 42: 308-316.
- [8] Del Valle E.M. 2003. Cyclodextrins and their uses: a review. Process Biochem. 39: 1033-1046.
- [9] EFSA, 2008. Reglamento (CE) nº 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre aditivos alimentarios.

Reduction of the environmental impact in the agri-food industry through the transformation of bio-waste into new foods processed with emerging technologies

Reducción del impacto ambiental en la industria agroalimentaria mediante la transformación de biorresiduos en nuevos alimentos procesados con tecnologías emergentes

P. Martínez^{1,2*}, A. Martínez^{1,2}, E. Aguayo^{1,2}

¹Unidad de Calidad Alimentaria y Salud del Instituto de Biotecnología Vegetal.

²Grupo de Postrecolección y Refrigeración. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena.

*paloma.martinez@edu.upct.es

Abstract

This work will study the development of new food products obtained from food industry bio-waste. The main objective is to reduce the environmental impact of the agri-food industry by reducing waste or revaluing by-products and applying eco-innovative techniques, as high hydrostatic pressures, as an alternative to conventional heat treatments in food processing.

Keywords: High hydrostatic pressure; cremogenated; by-product; eco-innovative technology.

Resumen

La presente investigación abordará la elaboración de nuevos productos alimentarios obtenidos a partir de biorresiduos procedentes de la industria alimentaria. El objetivo principal es reducir el impacto ambiental de esta industria disminuyendo los residuos o revalorizando sus subproductos y aplicando técnicas eco-innovadoras, como las altas presiones hidrostáticas, como alternativa a los tratamientos térmicos convencionales utilizados en el procesamiento de alimentos.

Palabras clave: Altas presiones hidrostáticas; cremogenado; subproducto; tecnologías ecoinnovadoras.

1. INTRODUCCIÓN

La Región de Murcia es un importante productor de frutas y hortalizas y cuenta con una industria agroalimentaria que genera grandes cantidades de biorresiduos a partir de materia prima que no cumple determinadas características que se exigen para ser consumida en fresco [1]. Estos biorresiduos constituyen una fuente de subproductos que pueden revalorizarse y ser integrados de nuevo en la cadena alimentaria [2,3]. Estas pérdidas generadas durante el cultivo y transformación del producto agroalimentario generan no sólo un desperdicio de los recursos

utilizados en su producción, sino también un grave problema medioambiental relacionado con la gestión de los biorresiduos producidos [4]. Paralelamente, existe una creciente preocupación por el consumo de alimentos saludables, poco procesados y con propiedades beneficiosas para la salud frente a los productos ultraprocesados [5]. En este contexto, están proliferando en los lineales de los supermercados productos naturales, sin aditivos ni conservantes, en forma de smoothies, sopas frías, snacks, etc.

El presente trabajo se centrará en la transformación de los biorresiduos procedentes de la industria agroalimentaria en nuevos productos de alto valor nutricional y/o funcional, procesados mediante técnicas más respetuosas con el medio ambiente. Para ello, se abordarán dos líneas principales de investigación: 1) Un producto fresco, como es un cremogenado, a través del cual se elaborarán nuevos productos que serán procesados mediante tecnología de altas presiones hidrostáticas (APH). Esta técnica puede garantizar la seguridad microbiológica alterando mínimamente las propiedades sensoriales, físicas y nutricionales y permite prolongar la vida útil de numerosos alimentos [6]. 2) Un deshidratado, tipo snack, obtenido mediante diferentes técnicas de secado. Los procesos de deshidratación requieren de un elevado coste energético, sin embargo, la deshidratación osmótica podría reducir el coste energético del secado por liofilización al requerir de un menor tiempo. Además, puede mejorar las propiedades sensoriales y nutricionales del nuevo alimento deshidratado [7].

El objetivo general de esta tesis consiste en ayudar a mejorar la gestión del sector agroalimentario mediante la revalorización de biorresiduos alimentarios de la Región de Murcia por medio de su transformación en nuevos alimentos, saludables y nutritivos, procesados mediante técnicas más sostenibles y manteniendo la seguridad alimentaria del producto final. Este objetivo general se divide en los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar los subproductos agroalimentarios de las distintas industrias.
2. Obtener un cremogenado procedente de la transformación de estos biorresiduos.
3. Diseñar nuevos productos alimentarios (zumos, cremas, gazpachos, deshidratados, etc.).
4. Obtener un producto deshidratado mediante el estudio de distintas técnicas de secado.
5. Procesar los nuevos productos mediante técnicas sostenibles que garanticen la calidad sensorial, nutricional, funcional y microbiológica.
6. Optimización y modelización del proceso global, prediciendo la calidad, en función del biorresiduo, técnica emergente aplicada y producto final obtenido, estableciendo la vida útil.
7. Evaluación de costes y comparación con la alternativa convencional del tratamiento de biorresiduos (depósito en vertederos). Cálculo de la huella de carbono.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para lograr los objetivos propuestos se realizarán las siguientes determinaciones:

2.1 Calidad sensorial

Mediante un panel sensorial entrenado se evaluará en la Sala de Catas del Instituto de Biotecnología Vegetal de la UPCT, la apariencia visual, color, aroma, sabor, textura y aceptabilidad global del producto a través de una escala hedónica de 5 puntos, donde 3 es el límite de consumo.

2.2 Parámetros físico-químicos (color, pH, sólidos solubles totales-SST, acidez titulable-AT, densidad, turbidez y viscosidad)

El color se determinará con un colorímetro (Minolta CR-400, Ramsey, NJ, EEUU), la firmeza mediante un texturómetro, los SST con un refractómetro digital a 20 °C, el pH se calculará utilizando un pH-metro y la AT mediante un valorador automático. La densidad se obtendrá con

un picnómetro de tubo capilar, la turbidez mediante un turbidímetro y la viscosidad utilizando un reómetro a 20 °C.

2.3 Determinaciones de los enzimas oxidativos (polifenoloxidasas-PPO, peroxidasa-POD, pectínmetilesterasa-PME, poligalacturonasa-PG, superóxidodismutasa-SOD)

Estos análisis se realizarán en muestras congeladas siguiendo los protocolos de Arjmandi *et al.* [8]. La determinación de la SOD se efectuará midiendo la capacidad de inhibir la reducción fotoquímica del azul nitrotetrazolium (NBT) según Martínez -Hernández *et al.* [9].

2.4 Evaluación de la calidad microbiológica

Se utilizará la temperatura y medio de cultivo correspondiente según el microorganismo a estudiar. En los biorresiduos, cremogenados y elaborados finales, se evaluará la termorresistencia microbiana y los recuentos de microorganismos alterantes (bacterias psicrófilas, mohos y levaduras) y bacterias patógenas (*E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella*) durante la conservación de cada producto. La calidad microbiológica y vida útil se establecerá según el Reglamento Europeo 1441/2007 (2007).

2.5 Evaluación de la calidad nutricional y funcional

El producto final se congelará en N₂ líquido y se conservará a -80 °C hasta su análisis. En función del cremogenado y alimento final, se realizarán las determinaciones de los siguientes compuestos bioactivos: glucosinolatos mediante UPLC [10], vitamina C mediante HPLC [11] y caracterización del perfil polifenólico mediante UPLC-MS [12]. Además, por espectrofotometría se determinarán: fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu propuesto por Singleton y Rossi [13] con modificaciones [10,14], capacidad antioxidante total (ABTS [15], FRAP [16] y/o DPPH [17]), carotenoides (β -caroteno, α -caroteno, licopeno, luteína y criptoxantina) por espectrofotometría mediante el método descrito por la AOAC [18] con ligeras modificaciones [19] y por HPLC [20] y clorofilas (a + b+ total) [21].

3. RESULTADOS ESPERADOS

Los resultados esperados de la tesis se centrarán principalmente en la mejora de la gestión de los recursos de la industria alimentaria reduciendo las pérdidas y el desarrollo de nuevos productos alimentarios de gran calidad y con un alto contenido en compuestos bioactivos que puedan ejercer un efecto positivo en la salud del consumidor.

4. AGRADECIMIENTOS

A la Fundación Séneca, por la concesión de una beca predoctoral para la Formación del Personal Investigador.

5. REFERENCIAS

- [1] Gustavsson J., Cederberg C., Sonesson U. 2011. Global Food Losses and Food Waste. Save Food at Interpack Düsseldorf, Germany.
- [2] Ezekiel O., Aworh, O. 2018. Simultaneous saccharification and cultivation of *Candida utilis* on cassava peel. Innov. Food. Sci. Emerg. Technol. February 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.02.009>
- [3] Galanakis C.M. 2012. Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. Trends Food Sci. Technol. 26: 68–87.

- [4] Jin Q., Yang L., Poe N., Huang H. 2018. Integrated processing of plant-derived waste to produce value-added products based on the biorefinery concept. *Trends Food Sci. Technol.* 74: 119–131.
- [5] García-Parra J., González-Cebrino F., Delgado-Adámez J., Cava R., Martín-Belloso O., Elez-Martínez P., Ramírez R. 2018. Application of innovative technologies, moderate-intensity pulsed electric fields and high-pressure thermal treatment, to preserve and/or improve the bioactive compounds content of pumpkin. *Trends Food Sci. Technol.* 45: 53–61.
- [6] González-Cebrino F., Durán R., Delgado-Adámez J., Contador R., Ramírez R. 2013. Changes after high-pressure processing on physicochemical parameters, bioactive compounds, and polyphenol oxidase activity of red flesh and peel plum purée. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 20: 34–41.
- [7] Cano-Lamadrid M., Lech K., Michalska A., Wasilewska M., Figiel A., Wojdyło A., Carbonell-Barrachina Á. A. 2017. Influence of osmotic dehydration pre-treatment and combined drying method on physico-chemical and sensory properties of pomegranate arils, cultivar Mollar de Elche. *Food Chem.* 232: 306–315.
- [8] Arjmandi M., Otón M., Artés F., Artés-Hernández F., Gómez P. A., Aguayo E. 2016. Continuous microwave pasteurization of a vegetable smoothie improves its physical quality and hinders detrimental enzyme activity. *Food Sci. Technol. Int.* 23: 36–45.
- [9] Martínez-Hernández G. B., Artés-Hernández F., Gómez P. A., Formica A. C., Artés, F. 2013. Combination of electrolysed water, UV-C and superatmospheric O₂ packaging for improving fresh-cut broccoli quality. *Postharvest Biol. Technol.* 76: 125–134.
- [10] Martínez-Hernández G. B., Artés-Hernández F., Gómez P. A., Artés F. 2013. Induced changes in bioactive compounds of kailan-hybrid broccoli after innovative processing and storage. *J. Funct. Foods.* 5(1): 133–143.
- [11] Zapata S., Dufour J. 1992. Ascorbic, Dehydroascorbic and Isoascorbic Acid Simultaneous Determinations by Reverse Phase Ion Interaction HPLC. *J. Food Sci.* 57(2): 506–511.
- [12] Falagán N., Artés F., Gómez P.A., Artés-Hernández F., Pérez-Pastor A., de la Rosa J.M., Aguayo E. 2015. Combined effects of deficit irrigation and fresh-cut processing on quality and bioactive compounds of nectarines. *Hort. Sci.* 42: 125–131.
- [13] Singleton V. L., Rossi J. A. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16(3): 144–158.
- [14] Martínez-Hernández G. B., Gómez P. A., Artés F., Artés-Hernández F. 2011. Moderate UV-C pretreatment as a quality enhancement tool in fresh-cut Bimi® broccoli. *Postharvest Biol. Technol.* 62(3): 327–337.
- [15] Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1231–1237.
- [16] Aguayo E., Requejo-Jackman C., Stanley R., Woolf A. 2010. Effects of calcium ascorbate treatments and storage atmosphere on antioxidant activity and quality of fresh-cut apple slices. *Postharvest Biol. Technol.* 57(1): 52–60.
- [17] Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - J. Food Sci. Technol.* 28(1): 25–30.
- [18] AOAC. 1997. Association of Official Analytical Chemists International Official Methods of Analysis. 16th Edition, AOAC, Arlington.
- [19] Tarazona-Díaz M.P., Aguayo E. 2013. Assessment of by-products from fresh-cut products for reuse as bioactive compounds. *Food Sci. Technol. Int.* 19: 439–446.
- [20] Wright K. P., Kader A. A. 1997. Effect of slicing and controlled-atmosphere storage on the ascorbate content and quality of strawberries and persimmons. *Postharvest Biol. Technol.* 10(1): 39–48.
- [21] Martínez-Sánchez A., Allende A., Bennett R.N., Ferreres F., Gil M.I. 2006. Microbial, nutritional and sensory quality of rocket leaves as affected by different sanitizers. *Postharvest Biol. Technol.* 42(1): 86–97.

POSTER SESSION II:

Plant Production Technology
and Engineering

Functional regeneration of soils affected by mine wastes in Mediterranean environments and their resilience against climate change scenarios

Regeneración funcional de suelos afectados por residuos mineros en ambientes Mediterráneos y su resiliencia frente a escenarios de cambio climático

A. Peñalver-Alcalá^{1*}, J. Álvarez-Rogel¹, M.N. González-Alcaraz²

¹Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria. Área de Edafología y Química Agrícola. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica-UPCT. Paseo Alfonso XIII, 48, Cartagena, 30203 Murcia, Spain.

²Department of Biology & CESAM, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal.

*antonio.penalver@upct.es

Abstract

Soils affected by mine wastes might show stressful conditions for biota, as well as to pose a risk of transfer of potentially toxic compounds to the environment. This may worsen in the upcoming decades since these soils, whose functional and structural characteristics are deteriorated, will have less adaptation capability (resilience) to climate change. The objective of the thesis is to know functional and structural aspects of the soil related to ecosystem regeneration, in Mediterranean environments affected by mine wastes, and to evaluate its resilience against climate change scenarios. Moreover, the aim is also to evaluate if organic amendments addition might improve soil functionality and its response to changing climate conditions. To achieve this, environments with different degree of vegetal colonization will be studied. The initial results show that functional and structural differences might exist among the different environments selected, in relation with the distinct stage of vegetal colonization. The addition of organic amendments to these soils could be an adequate management practice to improve their properties.

Keywords: Biochar; metallic contamination; biogeochemistry cycles; ecosystem services; ecotoxicity.

Resumen

Los suelos afectados por residuos mineros pueden presentar condiciones estresantes para los organismos vivos, además de suponer un riesgo de transferencia de compuestos potencialmente tóxicos al medio. Esto podría verse agravado en un futuro, ya que tales suelos, cuyas características funcionales y estructurales están deterioradas, tendrán menor capacidad de adaptación (resiliencia) frente al cambio climático. El objetivo de la tesis doctoral es conocer aspectos funcionales y estructurales del suelo relacionados con la regeneración del ecosistema, en ambientes Mediterráneos afectados por residuos mineros, y valorar su resiliencia frente a escenarios de cambio climático. Para ello se estudiarán ambientes con distinto grado de colonización vegetal. Además, se pretende evaluar si la adición de enmiendas orgánicas puede contribuir a mejorar la funcionalidad de los suelos y su respuesta frente a dichos escenarios. Los resultados iniciales indican que pueden existir diferencias funcionales y estructurales entre los distintos ambientes seleccionados, relacionadas con diferentes etapas de colonización vegetal. La adición de enmiendas orgánicas a estos suelos puede ser una práctica de manejo adecuada para mejorar sus propiedades.

Palabras clave: Biochar; contaminación metálica; ciclos biogeoquímicos; servicios ecosistémicos; ecotoxicidad.

1. INTRODUCCIÓN

La regeneración de la cubierta vegetal y la mejora de las propiedades edáficas son aspectos esenciales para la recuperación de ecosistemas terrestres degradados y la provisión de sus servicios ecosistémicos (p.e. retención de contaminantes, mantenimiento de la biodiversidad, secuestro de carbono, etc.). Para ello, es clave que se restauren las características funcionales (p.e. ciclos biogeoquímicos y propiedades relacionadas) y estructurales (tipos de organismos/microorganismos) del suelo, ya que ambos aspectos determinan en gran medida la capacidad de adaptación del sistema frente a los daños que recibe (resiliencia). Algunas de las condiciones más desfavorables para esta recuperación ocurren en antiguas zonas mineras, en especial en depósitos de residuos mineros abandonados. El abandono de estos depósitos “in situ”, tras el cese de la actividad minera, constituye un foco potencial de contaminación para su entorno, facilitando la dispersión de sustancias potencialmente tóxicas [1]. La acumulación de contaminantes en estos depósitos y en los suelos circundantes lleva a condiciones severas de estrés para biota del suelo, así como para la vegetación que vive en estos ambientes.

Dado que los ecosistemas degradados son menos resilientes, el cambio climático puede agravar los impactos negativos que ya de por sí tiene la contaminación [2]. Diversos estudios [3] han previsto que bajo escenarios de cambio climático [4] se modificará la biodisponibilidad de los contaminantes edáficos (p.e. metales) al alterarse los ciclos biogeoquímicos, aumentando los riesgos de toxicidad. Estudios recientes han descrito cómo algunas especies vegetales pioneras pueden formar parches de vegetación espontánea en depósitos de residuos mineros, mejorando sus propiedades edáficas, promoviendo los procesos de colonización de otras plantas [5]. Sin embargo, no se conoce en detalle cómo estos fenómenos modifican las características funcionales y estructurales de los suelos y sus relaciones con la vegetación colonizadora.

El objetivo general de la tesis doctoral es conocer aspectos funcionales y estructurales del suelo relacionados con la regeneración del ecosistema, en ambientes Mediterráneos afectados por residuos de minería metálica, y valorar su resiliencia frente a escenarios de cambio climático. Además, se pretende evaluar si la adición de biochar y compost de residuos sólidos urbanos (RSU) a estos suelos puede contribuir a mejorar su funcionalidad y su respuesta frente a dichos escenarios de cambio climático. La hipótesis de partida es que los ambientes con mayor colonización vegetal presentarán características más cercanas al bosque control y también serán más resilientes frente a los impactos.

Los objetivos específicos son: (1) Profundizar en el conocimiento funcional (propiedades físicas y biogeoquímicas incluyendo microbiología y mineralización de materia orgánica) y estructural (tipos de organismos/microorganismos) de los nichos edáficos en zonas mineras y su relación con la colonización vegetal, para comprender con mayor detalle el papel del suelo como soporte de la regeneración natural espontánea del ecosistema; (2) Evaluar la resiliencia de los nichos edáficos en zonas mineras frente a escenarios de cambio climático basados en variaciones de CO₂ atmosférico, temperatura y humedad edáfica, tanto a nivel funcional como estructural y a través de cambios en su toxicidad; (3) Evaluar el efecto que puede tener la adición de enmiendas orgánicas (biochar y compost de RSU) sobre la regeneración funcional del suelo de zonas mineras y su resiliencia frente a escenarios de cambio climático, evaluando estos aspectos de la misma forma que para el objetivo 2.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Trabajo de campo (afecta a los objetivos 1 y 3)

La zona de estudio se localiza en el Distrito Minero de La Unión-Cartagena, Murcia, SE de España, que tiene clima Mediterráneo semiárido (precipitaciones medias anuales entre 200 y 300 mm, temperatura media anual $\approx 17^{\circ}\text{C}$ y tasas medias anuales de evapotranspiración de $\approx 860\text{mm}$). Se han establecido parcelas de 4m^2 ($n=4$) para el estudio de seis ambientes: 1. Zonas sin vegetación en depósitos mineros (S); 2. Individuos aislados de *Pinus halepensis* que han colonizado de forma espontánea depósitos mineros (P); 3. Individuos aislados de *P. halepensis*, bajo los que crecen hierbas y matorrales, que han colonizado de forma espontánea depósitos mineros (I); 4. Grupos de individuos de *P. halepensis* que forman pequeños bosquetes con hierbas y matorrales, que han colonizado de forma espontánea depósitos mineros (G); 5. Bosque de *P. halepensis* afectado por residuos mineros (A); 6. Bosque de *P. halepensis* no afectado por residuos mineros (zona control, C). Además, se trabajará en una zona sin vegetación de un depósito minero, en parcelas anexas al ambiente S, donde se adicionará biochar (al 3% en peso) mezclado con RSU (al 1% en peso) como enmienda (ambiente B). Características del biochar: pH 1:5=9,9 \pm 0,1; carbono orgánico oxidable (CO)=30,3 \pm 1,4 g kg⁻¹; nitrógeno total (NT)=7,04 \pm <0,1 g kg⁻¹; CaCO₃=30,3 \pm 2,9 g kg⁻¹. Características del RSU: pH 1:5=7,43 \pm 0,09; CO=206 \pm 3 g kg⁻¹; NT=22 \pm 0,4 g kg⁻¹; CaCO₃=159 \pm 3 g kg⁻¹.

Se está realizando la caracterización de los suelos de cada ambiente, que incluirá, entre otros parámetros: granulometría; estructura; carbonato cálcico; contenido de metales y metaloides; identificación de invertebrados edáficos. Además, se estudiará la variabilidad estacional de: CO₂ desprendido del suelo por respiración microbiana; pH; salinidad (conductividad eléctrica, CE); CO; NT; metales y metaloides; descomposición de la materia orgánica (tea bag index) [6]; actividad alimentaria de la fauna del suelo (Bait Lamina Sticks, <http://www.terra-protecta.de/englisch/ks-info-en.htm>); actividades enzimáticas y carbono de la biomasa microbiana (CBM); grupos funcionales de microorganismos (Biolog EcoPlate®) [7].

2.1 Trabajo en cámaras climáticas (afecta a los objetivos 2 y 3)

Durante 4-5 meses se incubarán muestras de suelo de cada uno de los ambientes estudiados en campo en cámaras climáticas, simulando escenarios de cambio climático [5] basados en combinaciones de humedad edáfica (50% y 30% de la capacidad de retención hídrica del suelo), temperatura (28 y 32 °C) y CO₂ atmosférico (400 y 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$). Durante las incubaciones se realizará el seguimiento y análisis de los mismos parámetros que durante el trabajo de campo. Además, se llevará a cabo la evaluación de la toxicidad al final de las incubaciones, utilizando invertebrados edáficos, semillas y plántulas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los suelos presentaron elevado contenido en arena (textura franco arenosa o arenosa franca). Se observaron distintos grados de desarrollo estructural en los suelos: desde empaquetamientos laminares sin estructura (S y B), hasta estructuras grumosas y angular blocosa (C), coincidiendo estas últimas con un mayor contenido de CBM (Tabla 1) en los ambientes con mayor colonización vegetal. En la zona sin vegetación (S) el pH fue de $\approx 5,5$ y CaCO₃ <5 g kg⁻¹. La adición de la enmienda elevó el pH a $\approx 7,6$ y el contenido en CaCO₃ a ≈ 9 g kg⁻¹. En el resto de suelos el pH fue $\approx 7,5$ (Tabla 1) y el contenido en CaCO₃ entre 28 (P) y 149 (C) g kg⁻¹. Los valores de salinidad (CE) y contenido en metales/metaloides totales fueron elevados en todos los ambientes, siendo menores en A y C, que a su vez mostraron valores más elevados de carbono orgánico total (COT) y NT que el resto de suelos (Tabla 1).

4. CONCLUSIONES

Las características observadas en los suelos de cada uno de los ambientes estudiados en los depósitos mineros indican que pueden existir diferencias estructurales y funcionales entre ellos, con propiedades del suelo más próximas a las del bosque control en los ambientes con mayor colonización vegetal. La adición de biochar y RSU al suelo sin vegetación puede ser una práctica de manejo adecuada para mejorar sus propiedades, ya que indujo un efecto de dilución de los contaminantes, una elevación del pH y un aporte de materia orgánica.

5. AGRADECIMIENTOS

Proyecto financiado por el Ministerio de Industria, Economía y Competitividad (CGL2016-80981-R) y por fondos FEDER.

6. REFERENCIAS

- [1] Dudka S., Adriano D.C. 1997. Environmental impacts of metal ore mining and processing: a review. *J. Environ. Qual.* 26: 590-602.
- [2] COM. 2006. Thematic Strategy for Soil Protection 231.
- [3] González-Alcaraz M.N., van Gestel C.A.M. 2015. Climate change effects on enchytraeid performance in metal-polluted soils explained from changes in metal bioavailability and bioaccumulation. *Environmental Research.* 142: 177-184.
- [4] IPCC. 2013. *Climate Change 2013: The Physical Science Basis.* Cambridge University Press.
- [5] Párraga-Aguado I., Querejeta J.L., González-Alcaraz M.N., Jiménez-Cárceles F.J., Conesa H.M. 2014. Usefulness of pioneer vegetation for the phytomanagement of metal(loid)s enriched tailings: grasses vs. shrubs vs. trees. *J. Environ. Manag.* 133: 51-58.
- [6] Keuskamp J.A., Dingemans B.J.J., Lehtinen T., Sarneel J.M., Hefting M.M. 2013. Tea Bag Index: a novel approach to collect uniform decomposition data across ecosystems. *Methods in Ecology and Evolution.*
- [7] Sofo A., Palese A.M., Casacchia T., Celano G., Ricciuti P., Curci M., Crecchio C., Xiloyannis C. 2010. Genetic, Functional, and Metabolic Responses of Soil Microbiota in a Sustainable Olive Orchard. *Soil Science.*

Tabla 1. Caracterización de los ambientes (medias \pm error estándar; n=4). pH y CE (dS m^{-1}) en 1:2,5. COT (g kg^{-1}); NT (g kg^{-1}); CBM (mg C kg^{-1}); metal(oideos) totales (g kg^{-1} , excepto Fe en %).

Amb	pH	CE	COT	NT	CBM	Fe	Mn	Pb	Zn	As
S	5,52 \pm 0,22	6,55 \pm 1,37	2,82 \pm 0,13	0,31 \pm 0,08	2,67 \pm 1,43	15,3 \pm 0,3	1,83 \pm 0,16	5,35 \pm 0,37	8,60 \pm 2,21	0,22 \pm 0,03
P	7,41 \pm 0,06	2,56 \pm 0,02	5,66 \pm 1,00	0,34 \pm 0,06	128 \pm 74	15,8 \pm 0,3	3,25 \pm 0,06	7,96 \pm 0,23	17,9 \pm 0,7	0,25 \pm 0,02
I	7,32 \pm 0,29	2,20 \pm 0,10	13,3 \pm 1,5	0,66 \pm 0,09	134 \pm 10	29,2 \pm 1,3	9,63 \pm 1,19	14,6 \pm 0,8	12,2 \pm 1,0	1,25 \pm 0,17
G	7,69 \pm 0,13	1,42 \pm 0,29	12,7 \pm 2,4	0,71 \pm 0,06	170 \pm 13	22,5 \pm 0,4	10,8 \pm 0,3	10,2 \pm 0,2	13,2 \pm 0,7	0,79 \pm 0,02
A	7,97 \pm 0,07	0,48 \pm 0,09	47,6 \pm 4,5	2,10 \pm 0,15	304 \pm 19	17,4 \pm 0,6	7,44 \pm 0,23	8,65 \pm 0,15	9,23 \pm 0,36	0,62 \pm 0,03
C	7,16 \pm 0,34	0,76 \pm 0,06	107 \pm 6	4,66 \pm 0,08	1523 \pm 520	2,7 \pm 0,2	1,50 \pm 0,25	1,34 \pm 0,24	0,76 \pm 0,07	0,07 \pm 0,01
B	7,62 \pm 0,07	3,92 \pm 0,48	40,2 \pm 9,4	0,55 \pm 0,09	43 \pm 20	12,3 \pm 0,8	1,51 \pm 0,11	4,10 \pm 0,30	6,18 \pm 1,17	0,17 \pm 0,01

Sustainable precision irrigation in citrus with water of different quality

Riego de precisión sostenible en cítricos con aguas de diferente calidad

A.B. Mira-García*, M.C. Ruiz-Sánchez, E. Nicolás-Nicolás

¹Dpto. Riego, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), Apartado 164, Campus de Espinardo, 30100 Murcia, Spain.

*abmira@cebas.csic.es.

Abstract

In Spain, agricultural development in general, and citrus in particular, is limited mainly by the scarcity of water resources. This panorama of water deficit makes it necessary to search for solutions that improve the water use efficiency. The main objective of this study is the evaluation of the sustainability of precision irrigation in citrus trees, with special attention to the use of water resources of different quality and sensors of the soil-plant-atmosphere system. The trial will be carried out on a plot of young lime trees (*Citrus latifolia* Tan., cv. Bearss), where water needs will be determined by water balance in pots-lysimeters and the effect of various practices (cultivation in ridges and shade screen) will be evaluated and in another plot of adult grapefruit trees (*Citrus paradisi* Macf., cv. Star Ruby) in which the agronomical and physiological response to deficit irrigation with saline water from tertiary wastewater treatment plant will be evaluated. The expected results of this study will allow us to have a scientific-technical knowledge of precision irrigation in citrus trees.

Keywords: Deficit irrigation; sensors of water status; thermography; water needs.

Resumen

En España, el desarrollo agrario en general, y cítrico en particular, se encuentra limitado principalmente por la escasez de recursos hídricos. Este panorama de déficit hídrico hace necesaria la búsqueda de soluciones que mejoren la eficiencia en el uso del agua. El objetivo principal de este estudio es la evaluación de la sostenibilidad del riego de precisión en cítricos, con especial atención al uso de recursos hídricos de distinta calidad y de sensores del sistema suelo-planta-atmósfera. El ensayo se llevará a cabo en una parcela de árboles jóvenes de limero (*Citrus latifolia* Tan., cv. Bearss), en donde se determinarán las necesidades hídricas mediante balance hídrico en macetas-lisímetros y se evaluará el efecto de diversas prácticas (cultivo en meseta y con sombreado) y en otra parcela de árboles adultos de pomelo (*Citrus paradisi* Macf., cv. Star Ruby) en los que se evaluará la respuesta agronómica y fisiológica al riego deficitario con agua salina procedente de EDAR. Los resultados esperables de este estudio nos permitirán disponer de un conocimiento científico-técnico del riego de precisión en cítricos.

Palabras clave: Necesidades hídricas; riego deficitario; sensores de estado hídrico; termografía.

1. INTRODUCCIÓN

En España, la producción citrícola se concentra principalmente en las regiones de Murcia, Andalucía y Comunidad Valenciana (<http://www.mapama.gob.es>). En la Región de Murcia, el desarrollo de este cultivo se encuentra limitado principalmente por la escasez de agua. Esta falta de agua, está provocada principalmente por la escasez de precipitaciones (≈ 369 mm/año), así como por la baja efectividad de las mismas. Ante este panorama de déficit hídrico, se hace necesaria la búsqueda de soluciones que fomenten el uso eficiente de agua, con el fin de reducir los consumos de agua y energía. En este sentido, el uso de estrategias de Riego deficitario controlado (RDC) [1], junto con la aplicación de riegos en precisión basados en la monitorización del sistema suelo-planta-atmósfera [2], fomentan el uso eficiente del agua. A su vez, la aplicación de fuentes de agua alternativas (regeneradas, de pozo o desalinizadas) también supone una solución a este problema.

En este sentido, el objetivo principal de este proyecto de Tesis es la evaluación de la sostenibilidad del riego de precisión en cítricos, con especial atención al uso de recursos hídricos de distinta calidad y de sensores del sistema suelo-planta-atmósfera.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

El ensayo se llevará a cabo en árboles jóvenes de limero (*Citrus latifolia* Tan., cv. Bearss) y árboles adultos de pomelo (*Citrus paradisi* Macf., cv. Star Ruby), ambos injertados sobre *Citrus macrophylla* L.. La parcela de limeros (≈ 1 ha) se encuentra localizada en la finca experimental del CEBAS, en Santomera (Murcia). Los árboles tienen un marco de plantación de 6 m x 5 m y el sistema de riego consiste en un doble lateral de riego con 4 goteros por árbol de 4 L h⁻¹. En la misma parcela también se dispone de 3 lisímetros de drenaje de 2 m x 2 m x 1.25 m y de una batería de 17 macetas de 80 L. La parcela de pomelos tiene una superficie de 1 ha y está localizada en la finca comercial “Lo Montero” en Molina de Segura (Murcia). El marco de plantación es de 6 m x 4 m, y el sistema de riego es localizado con 3 goteros de 4 L h⁻¹ por árbol.

2.2 Tratamientos hídricos

La programación del riego en los árboles jóvenes de limero será automática basada en valores umbrales de humedad del suelo (con sensores de tipo capacitivo), obtenidos en las macetas-lisímetros, para completar las necesidades hídricas del cultivo. Además se ensayarán condiciones de cultivo con y sin meseta, con y sin malla de sombreado.

En la parcela de pomelo se establecerán 4 tratamientos de riego, un tratamiento control, regado al 100% ET_c y otro RDC, regado al 50% de la ET_c durante la fase II de crecimiento del fruto, ambos para dos fuentes de agua: trasvase Tajo-Segura y agua salina procedente de EDAR.

2.3 Medidas

En los limeros, las necesidades hídricas (ET) se calcularán con la ecuación genérica de balance hídrico:

$$ET = R + P - \Delta S - D - E$$

en donde, la evapotranspiración de la planta (ET) se produce a expensas del agua almacenada en la zona radical (ΔS), la cual proviene del riego (R) y la lluvia (P), descontando la que se pierde por drenaje (D) y escorrentía (E). Todos los parámetros de la ecuación serán registrados en continuo con un sistema de telemetría. Además, se dispone de una estación agro-meteorológica para la determinación de la evapotranspiración del cultivo de referencia (ET₀).

El control del estado hídrico del suelo se realizará en continuo en ambas parcelas mediante sensores de contenido de agua en el suelo de tipo capacitivo (EnviroScan) y de potencial matricial (Watermark).

El estado hídrico de la planta se evaluará con medidas quincenales del potencial hídrico de la hoja (Ψ_{hoja}) y del tallo (Ψ_{tallo}) y del intercambio gaseoso: fotosíntesis neta (F_n) y conductancia estomática (g_s), y con el registro continuo de las fluctuaciones del diámetro del tronco (FDT), el flujo de savia (FS) y la temperatura de la cubierta vegetal (T_c).

El potencial hídrico se determinará con cámara de presión (Soil Moisture Equipment Corp., Santa Barbara, California, USA; model 3000) en hojas soleadas (Ψ_{hoja}) y en hojas tapadas (Ψ_{tallo}) al menos dos horas antes de la medida, a fin de reducir la transpiración de las mismas [3]. El intercambio gaseoso se determinará con un medidor portátil de fotosíntesis (LI-COR, LI-6400, Lincoln, NE, USA).

Las fluctuaciones del diámetro del tronco se medirán de manera continua con dendrómetros de desplazamiento lineal, con los que se calculará la máxima contracción diaria del tronco (MCD) [4], como la diferencia entre el valor máximo (MXCD) y mínimo (MNCD) diario del diámetro del tronco.

El flujo de savia se determinará en ambos cultivos, mediante el método pulso calor [5], que consiste en una aguja calefactora y dos sondas de temperatura, todas ellas de 1.8 mm de diámetro, que se insertan radialmente en el tronco del árbol.

La temperatura de la cubierta vegetal se medirá con termoradiómetros y cámaras termográficas: terrestre (manual) y aérea (drones). A partir de estas medidas se determinará el gradiente térmico, así como diversos índices multi-espectrales: CWSI, NDVI, etc.

En ambos cultivos se evaluará el crecimiento vegetativo estacional (longitud de brotes, diámetro del tronco, peso de poda y cobertura del dosel). Cada año se determinará la intensidad de floración, el cuaje y el crecimiento del fruto.

También se realizarán análisis foliares a fin de evaluar el estado nutricional de la planta. La concentración de nitrato/potasio en el suelo se determinará en ambos cultivos con sondas Nutrisens, en registro continuo.

La producción final (kilos y número de frutos por árbol) así como la calidad físico-química de la fruta se evaluará en ambos cultivos en los distintos momentos de la recolección. En el cultivo de la lima, se tomarán medidas del peso, volumen, diámetros, corteza, contenido en zumo, acidez, sólidos solubles y color, a fin de caracterizar su crecimiento. En el caso del pomelo, además, se realizarán estudios poscosecha de conservación en cámaras de atmósfera controlada con opción de generar ozono.

3. RESULTADOS ESPERABLES

A partir de este estudio de tesis se espera determinar las necesidades hídricas de limeros jóvenes mediante el balance hídrico en lisímetros de drenaje, para lo que se obtendrán los coeficientes de cultivo (K_c) y el calendario fenológico en condiciones locales. También se esperan obtener resultados en relación a la respuesta agro-fisiológica de pomelos adultos al riego deficitario controlado (RDC) con aguas regeneradas, determinando la evolución del estado hídrico y nutricional del cultivo y su relación con el contenido hídrico y salino del suelo, para establecer estrategias de reprogramación del RDC en función de valores umbrales máximos de conductividad eléctrica en el suelo tolerables por el cultivo, con los que finalmente se logre la sostenibilidad de la producción.

A su vez, se pretende igualmente determinar los índices del estado hídrico de los cítricos, basados en termografía de infrarrojos a partir de medidas con termoradiómetros (terrestre) y cámara termográfica (terrestre y aérea) en las distintas condiciones de riego y calidad de agua aplicada. Por último, también se espera obtener resultados en cuanto a la automatización del riego de precisión en las distintas condiciones de cantidad y calidad del agua aplicada en cítricos. Todo ello, contribuirá al conocimiento científico-técnico del riego de precisión en cítricos.

4. CONCLUSIONES

Con el fin de asegurar la producción cítrica de la región de Murcia (con especial referencia al cultivo del pomelo y del limero), se hace necesaria la búsqueda de alternativas que fomenten el uso eficiente de agua, con el fin de reducir los consumos de agua y energía. En este sentido, la programación de estrategias de riego deficitario controlado en base a sensores de estado hídrico del sistema suelo-planta-atmósfera, permitirá el ajuste del riego, aumentando así la eficiencia de uso del agua. A su vez el uso de aguas de diferente calidad también supone una alternativa interesante a la situación actual de déficit hídrico, contribuyendo al riego de precisión en los cítricos

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad- FEDER (AGL2016-77282-C3-1-R) y por la Fundación Séneca de la Región de Murcia (99/03/GERM/15).

6. REFERENCIAS

- [1] Ruiz-Sanchez, M.C., Domingo, R., Castel, J.R. 2010. Review. Deficit irrigation in fruit trees and vines in Spain. Spanish J. Agric. Res. 8: S5-S20.
- [2] Vera, J., Abrisqueta, I., Conejero, W., Ruiz-Sánchez, M.C. 2017. Precise sustainable irrigation: A review of soil-plant-atmosphere monitoring. Acta Hort. 1150: 195-200.
- [3] Turner, N.C. 1988. Measurement of plant water status by the pressure chamber technique. Irrig. Sci. 9: 289-308.
- [4] Goldhamer, D.A., Fereres, E. 2001. Irrigation scheduling protocols using continuously recorded trunk diameter measurements. Irrig. Sci. 20: 115-125.
- [5] Swanson, R.H., Whitfield, D.W.A. 1981. A numerical analysis of heat pulse velocity theory and practice. J. Exp. Bot. 32: 221-239.

Analysis of plant and soil water status indicators and its application to automatic deficit irrigation scheduling of fruit trees

Estudio de indicadores de estrés hídrico de suelo y planta y su aplicabilidad a la programación automática del riego deficitario en frutales

P. J. Blaya-Ros^{1*}, R. Torres², V. Blanco¹, R. Domingo¹

¹Departamento Producción Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena.

²Departamento Tecnología Electrónica, Universidad Politécnica de Cartagena, Campus Muralla del Mar, Doctor Fleming, s/n, 30202, Cartagena.

* pedro.blaya@upct.es

Abstract

In arid and semiarid regions where water is the main limiting factor of production, the use of deficit irrigation strategies linked to the use of new technologies can contribute to improving the efficiency and sustainability of irrigated agriculture. The present PhD Thesis' proposal aims at analysis of the different soil and plant status indicators in different water regimes, establishing threshold values for the optimization and automatic and remote scheduling of irrigation in fruit trees, just as the relationship of indicators studied with the agronomic response of the crop.

Keywords: TICs; *Prunus dulcis*; water relations.

Resumen

En regiones áridas y semiáridas donde el principal factor limitante de la producción es el agua, la utilización de estrategias de riego deficitario unido al uso de las nuevas tecnologías puede contribuir a la mejora de la eficiencia de uso y sostenibilidad de la agricultura de regadío. La presente propuesta de tesis doctoral pretende profundizar en el estudio de los diferentes indicadores del hídricos del suelo y planta a diferentes regímenes hídricos, establecimiento de valores umbrales para la optimización y programación automática y remota del riego en árboles frutales, así como la relación de los indicadores estudiados con la respuesta agronómica del cultivo.

Palabras clave: TICs; *Prunus dulcis*; relaciones hídricas.

1. INTRODUCCIÓN

Murcia, situada en el sureste español, es una región con predominantes zonas áridas y semiáridas de clima mediterráneo. Esta característica unida al buen hacer de sus gentes le ha convertido en un área con agricultura de primor altamente competitiva y tecnológicamente preparada para la incorporación de innovaciones de índole tecnológica o de manejo de nuevas estrategias de cultivo [1]. Sin embargo, los fuertes déficits hídricos estacionales dificultan de sobremanera la sostenibilidad de los agrosistemas murcianos. De ahí, que uno de los principales objetivos a nivel político y de la sociedad agraria en general haya y siga siendo la búsqueda de

fuentes alternativas de agua y la aplicación exacta y cuidadosa de los requerimientos de riego para satisfacer un criterio de programación técnico-económico. El constante aumento de la escasez de agua en la región, en parte debido a su alta demanda evaporativa (1300 mm año^{-1}) y baja precipitación (250 mm año^{-1}) obliga a mejorar la productividad del agua (PA). En almendro y en un gran número de especies frutales PA es superior a la obtenida en hortalizas o cultivos herbáceos, debido a que los procesos que determinan la producción en muchas especies frutales no son sensibles a la reducción de agua en determinados estados de desarrollo, y al hecho de que una determinada reducción en los aportes hídricos se traduce en una reducción mayor de la transpiración que en cultivos herbáceos y en consecuencia en un ahorro de agua mayor. Además, el desarrollo de un cierto nivel de estrés puede mejorar la calidad y conservación de los frutos [2].

La agricultura de regadío es con mucho el principal destinatario de los recursos hídricos disponibles en la región (>70%). Por ello, en situaciones de emergencia por sequía, estos recursos destinados a la agricultura son percibidos por el resto de los sectores de nuestra sociedad como la principal fuente de agua [2]. Esta realidad, ha dado lugar a nivel de campo a diversas actuaciones tendentes a racionalizar el uso del agua mediante estrategias de conservación del agua, como es el caso del riego deficitario controlado (RDC). Este consiste en imponer un déficit hídrico controlado en determinados periodos en los que la producción se ve poco a nada afectada y la calidad de las cosechas incluso se ve mejorada.

Ahora bien, para un manejo eficiente del uso del agua es necesario contar con indicadores del estado hídrico del suelo y/o de la planta sensibles al déficit hídrico, que nos permitan un conocimiento del estado hídrico de la plantación en todo momento [3]. El método más aceptado para la determinación del estado hídrico de la planta es la medida del potencial hídrico de hoja, $\Psi_{h,l}$, o tallo, Ψ_t , a mediodía con cámara de presión Scholander [4]. Sin embargo, este método, además de costoso en tiempo y labores asociadas, es destructivo y de difícil automatización. Por ello, de forma alternativa se vienen utilizando sensores en suelo y planta que proporcionan a través del registro automático medidas continuas de variables relevantes del estado hídrico de los cultivos [5]. Entre estas variables destacan las microvariaciones del diámetro de tronco [6, 7] flujo de savia [8], temperatura del dosel [9] o emisiones acústicas por cavitación en el xilema [5]. El uso más habitual de los sensores en planta ha sido el de la supervisión del riego, aunque también existen trabajos en los que se han usado para la programación automática o remota del riego [3, 10].

El objetivo principal de este trabajo de tesis es profundizar en el estudio de indicadores del estado hídrico en el continuo suelo-planta-atmósfera (CSPA) sensibles al estrés hídrico y fácilmente automatizables para su empleo en la programación del riego de árboles frutales. Esto permitiría ajustar los coeficientes, K_{cb} y K_e , a las características del cultivo y condiciones de humedad del suelo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se llevará a cabo en una parcela de almendros (*Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb) cv. 'Marta' de 1 ha de superficie y perteneciente a la Estación Experimental Agroalimentaria 'Tomás Ferro' de la Universidad Politécnica de Cartagena ($37^\circ 41' \text{ N}$, $0^\circ 57' \text{ E}$). Los árboles de 17 años de edad al inicio del ensayo e injertados sobre 'Mayor' (*Prunus dulcis* vs *Prunus pérsica*) están dispuestos a un marco $7 \text{ m} \times 6 \text{ m}$. El sistema de riego por goteo constará de dos laterales por hilera de árboles y emisores autocompensantes de 4 L h^{-1} a un metro de separación (12 emisores árbol⁻¹). El agua de riego que se utilizará es de buena calidad, presentando una conductividad eléctrica ($CE_{25^\circ\text{C}}$) de $1,07 \text{ dS m}^{-1}$. Todos los tratamientos recibirán idénticos cuidados agrícolas.

El ensayo constará de 6 tratamientos de riego con una distribución de bloques al azar con 3 repeticiones y 12 árboles por repetición. Los tratamientos de riego planificado son: i) Control,

CTL, regado, durante todo el ciclo, al 110% de la evapotranspiración del cultivo (ET_c), al objeto de asegurar condiciones no limitantes de agua en el suelo, ii) Secano, SCO, sin riego a excepción de algún riego de socorro al alcanzar un potencial de tallo, Ψ_t , inferior a -2,5 MPa, iii) dos tratamientos de riego deficitario sostenido, uno ligero, RDL con riego al 80% ET_c todo el año y otro moderado-severo (RDM) regado al 45% ET_c todo el año y iv) dos tratamientos de riego deficitario controlado, uno moderado (RDCM) y otro severo (RDSC) en los que el déficit hídrico controlado se aplicará durante la fase de llenado de grano (fase IV; junio – mediados de agosto). Por tanto, las estrategias RDC serán 100-45-100% ET_c y 100-30-100% ET_c para RDCM y RDSC, respectivamente. Todos los tratamientos estarán equipados con redes de sensores inalámbricas (WSN) con un nodo de comunicación por punto de medida. La dosis de riego se calculará semanalmente a partir de la estimación de ET_c propuesta por FAO:

$$ET_c = ET_0 \times K_c \times K_L.$$

donde, ET_0 es la evapotranspiración de referencia [11]; K_c , coeficiente de cultivo [12]; K_L , un coeficiente corrector por localización dependiente de la superficie del suelo cubierta por las copas de los árboles [13].

Los parámetros a medir y las técnicas a utilizar serán: (a) Planta: MCD, máxima contracción diaria y TCD, tasa de crecimiento diario de rama principal (dendrómetro), g_s conductancia estomática, A_{ml} fotosíntesis neta y E , transpiración (CIRAS2), T_c temperatura foliar (termoradiómetro), Ψ_t potencial hídrico de tallo (hojas cubiertas) [14], $\Psi_{h,l}$ potencial hídrico de hoja, $\Psi_{o,l}$ potencial osmótico de hoja (osmómetro) y $\Psi_{p,l}$ potencial de presión en hoja, clorofila (SPAD-502), parámetros de crecimiento vegetativo, del fruto, producción y calidad de la cosecha. (b) Suelo: θ_v contenido volumétrico de agua de forma continua y discreta (10HS y Diviner 2000), Ψ_m potencial matricial, T_s temperatura del suelo (MPS-6) y CE_e , conductividad eléctrica del extracto saturado. (c) Atmósfera: Las variables meteorológicas (ET_0 , DPV, temperatura, humedad, etc.) se obtendrán mediante la estación climática ubicada en ESEA-UPCT (CA12) y perteneciente a la red del Sistema de Información Agraria de Murcia, SIAM (<http://siam.imida.es>).

3. RESULTADOS ESPERABLES

Este proyecto de tesis profundizará sobre el funcionamiento hídrico de los frutales a través de la medida de diversos indicadores biológicos tradicionalmente empleados en el estudio de la respuesta de la planta a diferentes regímenes hídricos, y en particular el uso de la temperatura foliar (temperatura de superficie) en el manejo del riego. Para ello, se utilizarán plataformas de comunicación flexibles e inalámbricas las que proporcionarán el soporte necesario para el tratamiento de la información. De igual modo, este estudio busca establecer valores consigna de los indicadores estudiados para optimizar y automatizar la programación del riego en frutales y buscar modelos sencillos que permitan estimar un parámetro de interés en función de variables de fácil medida. Así como la relación de dichos indicadores con la respuesta agronómica del cultivo.

4. CONCLUSIONES

Con esta tesis de claro objetivo finalista, se pretende, a través del conocimiento del funcionamiento hídrico del árbol: i) establecer protocolos para la programación del riego deficitario en frutales en base a sensores en suelo y planta, ii) mejorar las eficiencias de uso del agua como vía para la sostenibilidad del regadío en zonas áridas y semiáridas, y iii) establecer relaciones entre diferentes parámetros de suelo, planta y clima como vía para poder predecir indicadores del estado hídrico en planta de laboriosa obtención a través de variables con mayor facilidad de obtención.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo será financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad del Gobierno de España, MINECO (Ref. AGL2016-77282-C3-3-R) y la Fundación Séneca de la Región de Murcia (Grupo de excelencia 2016-2019 Ref. 19895/GERM/15).

6. REFERENCIAS

- [1] Domingo, R., Nortes, P.A., Egea, G., Torres, R., Pérez-Pastor, A. 2005. Utilización de sensores en planta para la programación del riego. *Vida Rural* 217: 42-46.
- [2] Fereres, E., Rabanales, M.A. 2007. Deficit irrigation for reducing agricultural water use. *J. Exp. Bot.* 58: 147-159.
- [3] Puerto, P., Domingo, R., Torres, R., Pérez-Pastor, A., García-Riquelme, M. 2013. Remote management of deficit irrigation in almond trees based on maximum daily trunk shrinkage: Water relations and yield. *Agric. Water Manag.* 126: 33-45.
- [4] Shackel, K.A., Ahmadi, H., Biasi, W., Buchner, R., Goldhamer, D., Gurusinghe, S., Hasey, J., Kester, D., Krueger, B., Lampinen, B., McGourty, G., Micke, W., Mitcham, E., Olson, B., Pelletrau, K., Philips, H., Ramos, D., Schwankl, L., Sibbett, S., Snyder, R., Southwick, S., Stevenson, M., Thorpe, M., Weinbaum, S., Yeager, J. 1997. Plant water status as an index of irrigation need in deciduous fruit trees. *HortTechnology*. 7: 23-29.
- [5] Jones, H.G. 2006. Monitoring plant and soil water status: established and novel methods revisited and their relevance to studies of drought tolerance. *J. Exp. Bot.* 58: 119-130.
- [6] Goldhamer, D.A., Fereres, E. 2001. Irrigation scheduling protocols using continuously recorded trunk diameter measurements. *Irrig. Sci.* 20: 115-125.
- [7] Ortuño, M.F., Conejero, W., Moreno, F., Moriana, A., Intrigliolo, D.S., Biel, C., Mellisho, C.D., Pérez-Pastor, A., Domingo, R., Ruiz-Sánchez, M.C., Casadesus, J., Bonany, J., Torrecillas, A. 2010. Could trunk diameter sensors be used in woody crops for irrigation scheduling? A review of current knowledge and future perspectives. *Agric. Water Manag.* 97: 1-11.
- [8] Espadafor, M., Orgaz, F., Testi, L., Lorite, I.J., González-Dugo, V., Fereres, E. 2017. Responses of transpiration and transpiration efficiency of almond trees to moderate water deficits. *Sci. Hortic.* 225: 6-14.
- [9] Stoll, M., Jones, H.G. 2007. Thermal imaging as a viable tool for monitoring plant stress. *J. Int. des Sci. la Vigne du Vin* 41: 77-84.
- [10] Conejero, W., Mellisho, C.D., Ortuño, M.F., Moriana, A., Moreno, F., Torrecillas, A. 2011. Using trunk diameter sensors for regulated deficit irrigation scheduling in early maturing peach trees. *Environ. Exp. Bot.* 71: 409-415.
- [11] Allen, R.G., Pereira, L.S., Raes, D., Smith, M. 2006. Evapotranspiración del cultivo. Guías para la determinación de los requerimientos de agua de los cultivos. En: FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, (ed). FAO - irrigation and drainage paper 56. FAO, Rome, FAO. ed. Roma.
- [12] Steduto, P., Hsiao, T.C., Fereres, E., Raes, D. 2012. Crop yield response to water, FAO. ed. Roma.
- [13] Fereres, E., Castel, J.R. 1981. Drip Irrigation Management. Division of Agricultural Sciences, University of California (Leaflet 21259).
- [14] Hsiao, T.C. 1973. Plant responses to water stress. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 24: 519-570.

POSTER SESSION III:
Agrifood Biotechnology

Establishment of a sea bream (*Sparus aurata*) breeding program in the Region of Murcia

Establecimiento de un programa de mejora genética en dorada (*Sparus aurata*) en la Región de Murcia

M. Marín¹, E. Armero¹, E. María Dolores¹, G. Ramis²

¹Área de producción animal, Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena, España.

²Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 3100 Murcia, España.

mirenamm@gmail.com

Abstract

To overcome these drawbacks, companies carry out various actions related to food, handling their lots, preventing diseases and even the location of their facilities. However, the strategies that have involved genetic intervention on the breeding nuclei and, therefore, the productive stratum, have been very scarce and simple, through the development of selection programs for characters of economic interest for fish farmers. To this end, the objective of this thesis is to obtain seabream fingerlings from a batch of broodstock that are in the Spanish Institute of Oceanography, Marine Crops plant in the Azohía (Murcia), identify them individually with Passive Integrated Transponder, and raise them under the same industrial conditions of a company representative of the Region (Mediterranean Tuna Services). This population will be analyzed for growth characters and for other scarcely treated or unknown characters in gilthead bream, such as those of carcass and meat quality.

Keywords: Selection; growth; Sea bream carcass; meat

Resumen

La dorada es una especie que ocupa un papel importante dentro de la acuicultura española y cuya crianza se ha consolidado dentro del contexto europeo. A pesar de ello, su producción industrial presenta aun importantes inconvenientes como son la presencia de anomalías morfológicas desde edades muy tempranas o crecimientos no maximizados, entre otros. Para sobrellevar dichos inconvenientes las empresas llevan a cabo distintas actuaciones relacionadas con la alimentación, manejo de sus lotes, prevención de enfermedades e incluso la ubicación de sus instalaciones. Sin embargo, han sido muy escasas las estrategias que han implicado intervención genética sobre los núcleos de reproductores y por tanto, del estrato productivo, a través del desarrollo de programas de selección para caracteres de interés económicos para los piscicultores. Con este fin, el objetivo de la presente tesis es obtener alevines de dorada a partir de un lote de reproductores que se encuentran en el Instituto Español de Oceanografía, planta de Cultivos Marinos en la Azohía (Murcia), identificarlos individualmente con Passive Integrated Transponder, y criarlos bajo las mismas condiciones industriales de una empresa representativa de la Región (Servicios Atuneros del Mediterráneo). Esta población será analizada para caracteres de crecimiento y para otros caracteres escasamente tratados o desconocidos en dorada, como los de calidad de canal y de carne.

Palabras clave: Selección; crecimiento; canal y carne

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de los principales resultados que obtuvimos del proyecto PROGENSA, y que nos servirán como base para llevar a cabo el presente proyecto, observamos una alta variabilidad genética entre las distintas poblaciones de dorada estudiadas [1]. Esta circunstancia pone de manifiesto la falta de procesos de selección a los que ha sido sometida esta especie y, por tanto, la dorada se muestra con potencialidad genética para establecer programas de mejora exitosos.

En las poblaciones estudiadas se analizaron los siguientes caracteres de interés comercial: caracteres de crecimiento (peso y talla), de calidad de pez (malformaciones esqueléticas y vejiga natatoria), de calidad de canal (factor de condición y grasa visceral) y de calidad de carne (grasa muscular y parámetros texturales) [2-4].

Dichos caracteres presentaron heredabilidades considerables mostrándose cualquiera de ellos válidos como criterio de selección, si bien son los caracteres de crecimiento (heredabilidades 0.25 ± 0.06 para peso; 0.22 ± 0.07 para talla) y los relacionados con las malformaciones (heredabilidades 0.56 [0.17 - 0.69] para malformaciones en la columna vertebral y 0.46 [0.20 - 0.90] para malformaciones en el opérculo), los que presentan mayor repercusión económica para el sector. Además, destacaron por su relevancia las correlaciones genéticas positivas del peso con el factor de condición, porcentaje de grasa visceral y del filete; y negativas con malformaciones en la columna vertebral.

Por tanto, se propone la ausencia de malformaciones y caracteres de crecimiento (peso o talla) como criterios de selección en un programa de mejora genética en dorada. Si bien, a esta propuesta inicial se le debe hacer un seguimiento, evaluando cómo está siendo la respuesta tanto de estos caracteres como de los de calidad de canal y de carne, y cómo evolucionan los intereses del mercado.

Otro aspecto a considerar en el proceso de selección es el control de la consanguinidad. En el proyecto PROGENSA observamos que el incremento de la consanguinidad generacional podía oscilar desde 1.6% al 7%, dependiendo de que las contribuciones de los reproductores de los diferentes lotes fueran más o menos desiguales. Por tanto, en el proceso de selección debe optimizarse maximizando el progreso genético para los caracteres de interés con el mínimo incremento de consanguinidad generacional.

El objetivo general del presente proyecto es la puesta en marcha de un programa de mejora genética en dorada ("*Sparus aurata* L.") en la Región de Murcia, con objetivos particulares detallados en el programa de investigación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Puestas masales

Se establecerán puestas masales en el Instituto Español de Oceanografía (IEO) en la Azohía, a partir de un núcleo de reproductores de aproximadamente 150 animales.

2.2. Marcaje, alevinaje y engorde

Cuando se reciban los alevines, se aclimatarán, y se llevarán a un peso medio de 3 gr momento en el cual se marcarán en cavidad abdominal mediante el sistema Passive Integrated Transponder (PIT), hasta 1200 alevines. A la vez se obtendrá un trozo de la aleta caudal el cual será conservado en alcohol para la caracterización genética mediante marcadores microsatélite. En este momento se valorarán los parámetros de interés (peso, longitud y anomalías morfológicas). A partir de ahí se volverán a medir estos parámetros cada 15 días hasta alcanzar el peso de entrada a cebo.

2.3. Calidad del pez y de la carne

La calidad de pez y de carne se medirá del siguiente modo:

- Textura: se utilizará un texturómetro con un test de análisis de perfil. Los parámetros de textura que serán valorados serán: fracturabilidad, dureza, elasticidad, cohesividad, gomosidad, masticabilidad, adhesividad y resilience
- Color de la piel: se medirá en el tercio anterior por encima de la línea lateral, mediante un colorímetro Minolta. Los colores se expresarán como luminosidad, cromatismo y ángulo Hue.
- Colágeno total en músculo: mediante el análisis de hidroxiprolina.
- Composición química del músculo: mediante la determinación de los porcentajes de humedad, proteína, grasa y cenizas.
- Grasa visceral: mediante la separación de toda la grasa que se encuentre en cavidad peritoneal alrededor del digestivo.
- Valoración morfológica: para ello se hará fotografías laterales u dorsales a cada pez sobre fondo gris y con una regla blanca.
- Rendimiento canal: se obtendrá mediante el pesado del pez entero una vez eviscerado y secado con una balanza de precisión
- Rendimiento filete: obtenido mediante un corte perpendicular al eje longitudinal del pez, justo detrás del opérculo, inicialmente en dirección a la columna vertebral y posteriormente hacia la aleta caudal siguiendo paralelo a la columna. Se pesarán los filetes de ambos lados con una balanza de precisión
- Calidad comercial del pez: medida mediante la valoración visual de los peces de cualquier deformidad esquelética que presenten, especialmente opérculo, lordosis, fusiones y cabeza.
- Determinación de relaciones de parentesco mediante PCR multiplex y estimas de parámetros genéticos: a partir de la muestra de aleta caudal se procederá a la extracción del ADN mediante el kit DNeasy (QIAGEN®) y caracterización de todas las doradas cultivadas con SMsa1 (Super Multiplex *Sparus aurata*) descrita por Lee- Montero et al. (2013). Electroforegramas y genotipos serán analizados con GeneMapper software v.3.7 (Life Technologies®). También serán caracterizados los reproductores. La asignación de parentesco entre los reproductores y sus descendientes será realizada mediante el método de exclusión de Vitassing software v.8.2.1 [5].

Las estimas de parámetros genéticos serán realizadas mediante métodos de máximo verosimilitud, utilizando los programas desarrollados por Misztal (2010).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha partido de un lote de 140 doradas [90 ♀ y 50 ♂] de la Planta Experimental de Cultivos Marinos del Centro Oceanográfico de Murcia (Instituto Español de Oceanografía, IEO) como reproductores que no han sido sometidos a ningún proceso de selección. Todos los reproductores han sido identificados con Passive Integrated Transporter (PIT; Trovan Daimler-Benz) para disponer de una trazabilidad total, fueron pesados y medidos, y se procedió a la toma de una muestra de aleta para su posterior extracción de ADN y genotipado mediante la Supermultiplex de PCR de marcadores microsatélites SMsa1 [7].

El cultivo larvario se llevó a cabo en un tanque cilíndrico de 5 m³ de capacidad con la metodología estándar.

A los 251 días después de la eclosión (dpe), una muestra aleatoria de 2.500 alevines fue marcada individualmente en la cavidad abdominal con un PIT, siguiendo el protocolo descrito por Navarro et al. (2006), se registraron el peso y la longitud total. Los peces también se

inspeccionaron visualmente para examinar las deformidades externas en la columna vertebral (curvatura), opérculo (falta de opérculo) y el resto de la cabeza (deformidades del cráneo y la mandíbula).

4. CONCLUSIONES

Se ha comenzado con la puesta en marcha de un programa de mejora genética en dorada en la Región de Murcia con el fin de establecer el primer núcleo de reproductores seleccionados para caracteres de interés económico para el sector en la Región.

5. AGRADECIMIENTOS

A la Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente de la Región de Murcia (BORM 234, 7 octubre 2016) por su soporte económico.

La realización de la presente tesis doctoral es continuación del proyecto “Desarrollo de un Programa Piloto de Mejora Genética en Dorada (*Sparus aurata* L.)” [9] <http://www.progenssa.eu>, financiado por la Secretaria de la Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR).

6. REFERENCIAS

- [1] García-Celdrán M., G. Ramis, EMaría-Dolores, J. Peñalver, Borrell Y.J., M. Manchado, A. Estévez, J.M. Afonso, E. Armero. 2016. Genetic assessment of three gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) populations along the Spanish coast and of three broodstocks managements. *Aquaculture International*. DOI 10.1007/s10499-016-9998-8.
- [2] García-Celdrán M., G. Ramis, M. Manchado, A. Estévez, J.M. Afonso, E. María-Dolores, J. Peñalver, E. Armero 2015a. Estimates of heritabilities and genetic correlations of growth and external skeletal deformities at different ages in a reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) population sourced from three broodstocks along the Spanish coasts. *Aquaculture*. 445: 33 – 41.
- [3] García-Celdrán M., G. Ramis, M. Manchado, A. Estévez, J.M. Afonso, E. Armero. 2015b. Estimates of heritabilities and genetic correlations of carcass quality traits in a reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) population sourced from three broodstocks along the Spanish coasts. *Aquaculture* 446: 175-180
- [4] García-Celdrán M., G. Ramis, M. Manchado, A. Estévez, A. Navarro, E. Armero. 2015c. Estimates of heritabilities and genetic correlations of raw flesh quality traits in a reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) population sourced from broodstocks along the Spanish coasts. *Aquaculture* 446: 181- 186.
- [5] Vandeputte, M., Mauger, S., Dupont-Nivet, M., 2006. An evaluation of allowing for mismatches as a way to manage genotyping errors in parentage assignment by exclusion. *Mol. Ecol. Notes* 6: 265-267.
- [6] Misztal, I., 2010. Thrgibbs1f90 manual. Available at: <http://nce.ads.upa>.
- [7] Lee-Montero, I., Navarro, A., Borrell, Y., García-Celdrán, M., Martín, N., Negrín-Báez, D., Blanco, G., Armero, E., Berbel, C., Zamorano, M.J., Sánchez, J.J., Estévez, A., Ramis, G., Manchado, M., Afonso, J.M., 2013. Development of the first standardised panel of two new microsatellite multiplex PCRs for gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Anim. Genet.* 44, 533-546.
- [8] Navarro A, Oliva V, Zamorano JM, Ginés R, Izquierdo M, Astorga N, Afonso JM, 2006. Evaluation of PIT system as method to tag fin-gerling of gilthead seabream (*Sparus auratus* L.): effects on growth, mortality and tag loss. *Aquaculture* (en prensa).
- [9] PROGNSA, 2009. Desarrollo de un Programa Piloto de Mejora Genética en Dorada (*Sparus aurata* L.). Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino (MARM) Secretaria de la Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR), España. <http://www.progenssa.eu>.

Development of bioinformatics tools for phenotyping with artificial vision

Desarrollo de herramientas bioinformáticas para el fenotipado con visión artificial

M.V. Díaz-Galián^{1*}, P.J. Navarro², M. Egea-Cortines¹

¹Instituto de Biotecnología Vegetal, Edificio I+D+I, Campus Muralla del Mar 30202, Cartagena, (Murcia).

²DSIE, Plaza del Hospital s/n, Campus Muralla del Mar 30202, Cartagena (Murcia).

*mariavictoria.diaz@edu.upct.es

Abstract

High-throughput phenotyping with artificial vision is becoming central in biology. It provides information about non-appreciable characteristics. Furthermore, it is a non-invasive technique, with a low impact on the subject of study. We could discover the effect of mutations of circadian clock genes affecting growth speed of lateral organs, such as leaves, flowers and fruits. The main aim of my PhD would be the development of an automatic program of image analysis for plant phenotyping. Different plant materials are going to be studied (*Petunia*, *Antirrhinum majus*, *Arabidopsis* and strawberry) using the adequate bioinformatic tools (informatic languages such as Perl, Python, SQL or R); as well as a vision system, which will depend on the specific object of the experiment (infrared, RGB and hyperspectral) with a temperature and lightning control.

Keywords: Circadian clock; image processing; plant growth.

Resumen

El fenotipado de alta resolución mediante visión artificial está en pleno desarrollo, ya que nos permite obtener información de características no apreciables con otros métodos. Además, presenta ventajas como que es una técnica no invasiva, con un bajo impacto en el objeto de estudio. Con ella podríamos conocer el efecto de mutaciones en genes del reloj circadiano sobre la velocidad de crecimiento de los órganos laterales, como hojas, flores y frutos. El principal objetivo de mi doctorado sería el desarrollo de un programa automático de análisis de imagen para el fenotipado vegetal. Para ello se va a trabajar con distintos materiales vegetales (*Petunia*, *Antirrhinum majus*, *Arabidopsis* y Fresa) utilizando las herramientas bioinformáticas adecuadas (lenguajes informáticos como Perl, Python, SQL o R); así como un sistema de visión, que dependerá del objetivo específico del experimento (infrarrojo, RGB e hiperespectrales) con un control de temperatura e iluminación.

Palabras clave: Crecimiento vegetal; procesamiento de imágenes; reloj circadiano.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las técnicas ómicas están en pleno auge. Entre ellas se encuentra el análisis fenotípico, el cual es novedoso al poder obtener medidas no posibles con otras técnicas [1]. Centrándonos en las plantas, se puede estudiar el ángulo; la longitud; la velocidad de crecimiento y de movimiento de los distintos órganos (tallos, hojas y flores); la duración y dimensión de la apertura floral; estudio de fluorescencia de la clorofila u otros compuestos [1,2]. Además, hay que

tener en cuenta los cambios rítmicos en los parámetros físicos de temperatura e iluminación. Estos factores externos junto con los internos, genes, dan lugar al reloj circadiano que es el mecanismo por el que se coordinan cambios diarios en los comportamientos de la planta[3]. Sin embargo, esta técnica presenta dificultades por los cambios de posición que impiden la idónea toma de las medidas. Por ello, un reto de nuestros días es el desarrollo de software para la obtención de mediciones automáticas. [2,4,5]

En este trabajo se presentarán los resultados de *Antirrhinum majus* frente a *Antirrhinum linkianum*, donde se quería buscar diferencias en el patrón de movimiento, basándonos en evidencias apreciables en el fenotipo. Por otro lado, también se quería ver el efecto del cambio de fotoperiodo en las hojas de Petunia. Para ello, se trabajará en condiciones idóneas (12 horas de luz y 12 de oscuridad) y en 24 horas de luz u oscuridad. Por último, hay que comentar que los objetivos generales del doctorado son el desarrollo de programas automáticos de visión artificial para el fenotipado vegetal; la comparación de características fenotípicas en silvestres y mutantes, para genes involucrados en rutas de movimiento, crecimiento y/o floración; y el estudio de posibilidades de mercado

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para conseguir los objetivos propuestos se va a requerir de material vegetal, herramientas bioinformáticas y de una cámara para la realización de las imágenes.

2.1 Material vegetal

Dependiendo de las características propias de las plantas y de la información a obtener, se usará una visión lateral o aérea. Se va a trabajar con Petunia Mitchell (W115) [6], que pertenece a las Solanáceas y que tiene un crecimiento simpodial como la orquídea, tomate, pimiento, berenjena, etc; *Antirrhinum majus* 165E y su silvestre (*A. linkianum*) [7,8], por su crecimiento en espiga como el trigo; y la fresa, con un crecimiento en roseta como *Arabidopsis*, lechuga, etc.

2.2 Herramientas bioinformáticas

Se van a utilizar diferentes lenguajes informáticos como Perl, Python, SQL o R, según las necesidades. Además, se podría utilizar el sistema operativo Linux si las necesidades del estudio lo requieren. Actualmente se está haciendo uso de R-studio, gracias a las librerías de análisis de imagen “imager”, “bmp”, “imager” and “readr”. De igual forma, se está trabajando con el paquete MetaCycle [9], que tiene implementados los algoritmos ARSER, JTK_Cycle y Lomb-Scargle.

2.3 Cámara de visión

Durante el doctorado se trabajará con cámaras de infrarrojo, RGB e hiperspectrales, junto a los soportes necesarios para la correcta realización de las imágenes. Además, se tendrá un control de la temperatura y de la iluminación, las cuales podrán ser modificadas adaptándose a las condiciones idóneas de crecimiento del material vegetal o no, si lo que se busca es observar la respuesta a una condición de estrés.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como hemos comentado, uno de los problemas en la segmentación de las imágenes es el movimiento de las plantas. *A. linkianum* tiene un comportamiento rastrero, el cual no presenta

A. majus y por esta razón quisimos detectar la velocidad de movimiento de ambas, entre otros parámetros. Este movimiento se cuantificó con las medidas de desplazamiento del punto central de la planta (imágenes aéreas).

Como se puede observar en la Tabla 1, se confirma el mayor movimiento de *A. linkianum* al tener una media de velocidad mayor durante la noche, frente a *A. majus*. La relación entre ellas es de aproximadamente 2.33 veces más alto en *A. linkianum* frente a *A. majus*.

Por otro lado, intentamos estudiar el movimiento de plantas más grandes, usando *Petunia x hybrida* como modelo. Al observar las plantas se puede ver un patrón de apertura y cierre a lo largo del día en las hojas de la planta. Este movimiento podría ser circadiano. Consideramos que la hoja se podía dividir en tres zonas: peciolo; de peciolo a mitad de la hoja; y de la mitad de la hoja al final de la misma. En la Tabla 2 se muestran los resultados de la última sección al ser sometida a cambios en el fotoperiodo. La planta fue expuesta a condiciones de iluminación y oscuridad continua y a un fotoperiodo normal de 12 horas de luz y oscuridad.

Además, en la Tabla 2 se confirmó el patrón de apertura de las hojas durante periodos de iluminación y de cierre para los de oscuridad, lo que tiene un significado biológico puesto que durante las horas de luz la planta necesita captar la mayor cantidad de energía luminosa a través de sus receptores específicos [6,7]. El cambio de posición es una consecuencia del cambio de iluminación puesto que durante los fotoperiodos continuos (DD y LL) la desviación típica es menor indicando que hay una tendencia a permanecer en esos valores. Por esta razón, podría ser un movimiento circadiano [3].

4. CONCLUSIONES

La conclusión del experimento de *A. majus* y *A. linkianum* es que hay un patrón de movimiento distinto durante la noche entre los objetos de estudio. Por ello, habría que realizar estudios para saber si durante el día sucede lo mismo, así como investigaciones en campo para dilucidar si la causa es que *A. majus* es isogénica, mientras que *A. linkianum* no.

Mientras que para el estudio de *Petunia* se puede concluir que este movimiento está regulado muy fuertemente por la luz. Habría que estudiar la dinámica en cada etapa para obtener mayor información sobre el movimiento de las hojas.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se enmarca dentro del proyecto CDTI 5117/17CTA-P y PROYECTO BFU 2017 88300-C2-1-R

6. REFERENCIAS

[1] R. T. Furbank and M. Tester, "Phenomics – technologies to relieve the phenotyping bottleneck," *Trends Plant Sci.*, vol. 16, no. 12, pp. 635–644, Dec. 2011.

[2] P. Navarro, F. Pérez, J. Weiss, and M. E.-C. Sensors, "Machine learning and computer vision system for phenotype data acquisition and analysis in plants," *sensors*, vol. 16, no. 5, p. 641, 2016.

[3] J. M. Gendron, J. L. Pruneda-Paz, C. J. Doherty, A. M. Gross, S. E. Kang, and S. A. Kay, "Arabidopsis circadian clock protein, TOC1, is a DNA-binding transcription factor.," *P NATL ACAD SCI USA*, vol. 109, no. 8, pp. 3167–72, Feb. 2012.

[4] P. Navarro, C. Fernández, J. Weiss, and M. E.-C. Sensors, "Development of a configurable growth chamber with a computer vision system to study circadian rhythm in plants," *sensors*, vol. 12, no. 11, pp. 15356–15375, 2012.

[5] F. Perez-Sanz and P. Navarro, "Plant phenomics: an overview of image acquisition technologies and image data

analysis algorithms,” *Gigascience*, vol. 6, no. 11, pp. 1–18, 2017.

[6] A. Z. Mitchell, M. R. Hanson, R. C. Skvirsky, and F. M. Ausubel, “Anther Culture of Petunia: Genotypes with High Frequency of Callus, Root, or Plantlet Formation,” *Z PFLANZENPHYSIOL*, vol. 100, no. 2, pp. 131–145, Nov. 1980.

[7] V. Ruiz-Hernández, B. Hermans, J. Weiss, and M. Egea-Cortines, “Genetic Analysis of Natural Variation in Antirrhinum Scent Profiles Identifies BENZOIC ACID CARBOXYMETHYL TRANSFERASE As the Major Locus Controlling Methyl Benzoate Synthesis,” *Front PLANT SCI*, vol. 8, p. 27, Jan. 2017.

[8] Z. Schwarz-Sommer *et al.*, “A molecular recombination map of *Antirrhinum majus*,” *BMC PLANT BIOL*, vol. 10, p. 275, Dec. 2010.

[9] G. Wu, R. C. Anafi, M. E. Hughes, K. Kornacker, and J. B. Hogenesch, “MetaCycle: an integrated R package to evaluate periodicity in large scale data,” *Bioinformatics*, vol. 32, no. 21, pp. 3351–3353, Nov. 2016.

[10] K. NOZUE and J. N. MALOOF, “Diurnal regulation of plant growth,” *PLANT CELL Env.*, vol. 29, no. 3, pp. 396–408, Mar. 2006.

[11] A. Wiese, M. M. Christ, O. Virnich, U. Schurr, and A. Walter, “Spatio-temporal leaf growth patterns of *Arabidopsis thaliana* and evidence for sugar control of the diel leaf growth cycle,” *NEW PHYTOL*, vol. 174, no. 4, pp. 752–761, Jun. 2007.

Tabla 1. Media de velocidad *A.linkianum* y *A.majus*.

Especie	Velocidad±desviación estándar (cm/h)
<i>A.linkianum</i>	0.70±0.43
<i>A.majus</i>	0.30±0.19

Tabla 2. Media del ángulo en los diferentes fotoperiodos en Petunia.

Fotoperiodo	Ángulo (°)
Normal (DL)	-19.63±62.56
Luz continúa (LL)	-50.65±22.41
Oscuridad continúa (DD)	62.29±24.82

Development of loss of function alleles based on CRISPR/CAS9 to study flower and fruit development

Desarrollo de alelos de pérdida de función basados en CRISPR/CAS9 para estudio de desarrollo de flor y fruto

Semih Arbatli*, Julia Weiss; Marcos Egea-Cortines

Instituto de Biotecnología Vegetal, Edificio I+D+i, Universidad Politécnica de Cartagena 30202 Cartagena, Spain.

*arbatlis@gmail.com

Abstract

The CRISPR/cas9 system has taken over the methodologies to obtain new alleles as it is based on DNA repair mechanisms activated locally by DNA breakage. The CRISPR/Cas9 complex is driven by a guide RNA conferring specificity of action on a given DNA sequence. The aim of the work is to develop a set of alleles in genes of interest involved in flower and fruit development.

Keywords: Genetic engineering; developmental genetics.

Resumen

El sistema CRISPR/Cas9 se ha convertido en la tecnología más útil para obtener alelos nuevos al estar basada en el proceso local de reparación de ADN activado localmente por la rotura del ADN. El complejo CRISPR/Cas9 es guiado por una molécula guía de ARN que le da especificidad de acción sobre una secuencia de ADN concreta. El objetivo del trabajo es desarrollar una colección de alelos en genes de interés relacionados con el desarrollo de la flor y fruto

Palabras clave: Ingeniería genética; genética del desarrollo.

1. INTRODUCTION

Since the beginning of biological research, scientists aim to develop new gene editing technologies for prospering genome manipulations. The adoption of programmable nucleases in the advancement of genome editing technologies have significantly improved the ability to successful changes in eukaryotic genome.

To date, there are different types of gene editing strategies developed such as, meganucleases, Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs), Zinc Finger Nucleases (ZFNs) and the CRISPR-Cas9 system [1], [2]. Unfortunately, TALENs and ZFNs systems are mainly based on protein-DNA interactions which requires cloning of new protein for each target site [3]. Besides, by simply altering the guide RNA, Cas9 system can aim towards a new target location. Therefore, this feature makes CRISPR/Cas9 system a crucial element of gene editing strategies.

It has been shown that the CRISPR/Cas9 technology has been successfully used in Petunia and tomato [4][5] [6]. The aim of the PhD proposal is to develop a set of CRISPR/Cas9 based alleles in genes of interest for flower and fruit development. Antirrhinum, Petunia, tomato and Arabidopsis plants will be studied.

2. MATERIALS AND METHODS

Antirrhinum, petunia, tomato and Arabidopsis transformation protocols has been described below.

2.1 Gene Database development

The flowering and fruit development related genes of Antirrhinum, Petunia, Tomato and Arabidopsis plants will be selected and obtained from previous studies of our laboratories and online databases.

2.2 Plant Material

The *Petunia hybrida*, *Antirrhinum majus*, tomato and *Arabidopsis thaliana* will be grown in growth chamber conditions and the full development will be held in greenhouse followed by transformation of CRISPR/Cas9 technique. Seeds of *Petunia hybrida* line Mitchell and *Antirrhinum majus* will be surface-sterilized. The seeds will be sowed on Murashige and Skoog medium (Duchefa, Haarlem, Netherlands) and will be solidified with 4 g/L of Phytigel (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). The samples will be placed on growth chambers under a photoperiod of 12/12 h of light/dark and 25 °C/18 °C temperature.

2.3 Vector Construction

The vector construction will be established by conventional molecular cloning procedures. gRNAs and PCR primers will be created for selected gene families.

2.4 Transformation (Agrobacterium)

Transformation will be conducted by using *Agrobacterium tumofaciens* through suitable vector including the gene of interest for each specific context.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The correlation between the genes of interests and the developmental stages, especially circadian clock related pathways, of selected plants are aimed to be observed.

4. CONCLUSIONS

The simplicity and sustainability of CRISPR/Cas9 system makes it a valuable genome editing tool amongst other genome editing methods. The gene editing techniques having the ability to accelerate plant breeding by enabling the precise gene modifications. CRISPR/Cas9 technology is specifically important amongst all other gene editing technologies due to its ability to modify multiple traits simultaneously [7]. Moreover, the technique does not require any protein engineering processes.

In this PhD thesis, we aim to obtain CRISPR/Cas9 based alleles of Antirrhinum, Petunia hybrida, Tomato and Arabidopsis plants targeting the flower and fruit development genes.

5. ACKNOWLEDGMENTS

The experiments will be conducted in Institute of Plant Biotechnology (IBV), Cartagena within Polytechnic University of Cartagena.

6. REFERENCES

- [1] M. Christian *et al.*, "Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases," *Genetics*, vol. 186, no. 2, pp. 756–761, 2010.
- [2] Y. G. Kim, J. Cha, and S. Chandrasegaran, "Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 93, no. 3, pp. 1156–1160, 1996.
- [3] A. A. Dominguez, W. A. Lim, and L. S. Qi, "Beyond editing: repurposing CRISPR–Cas9 for precision genome regulation and interrogation," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 17, no. 1, pp. 5–15, 2015.
- [4] M. Manchado-Rojo, J. Weiss, and M. Egea-Cortines, "Validation of Aintegumenta as a gene to modify floral size in ornamental plants.," *Plant Biotechnol J.*, vol. 12, no. 8, pp. 1053–1065, Oct. 2014.
- [5] B. Zhang, X. Yang, C. Yang, M. Li, and Y. Guo, "Exploiting the CRISPR/Cas9 System for Targeted Genome Mutagenesis in Petunia.," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. February, p. 20315, 2016.
- [6] T. B. Jacobs, N. Zhang, D. Patel, and G. B. Martin, "Generation of a Collection of Mutant Tomato Lines Using Pooled CRISPR Libraries.," *Plant Physiol.*, vol. 174, no. 4, pp. 2023–2037, 2017.
- [7] L. Bortesi and R. Fischer, "The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond.," *Biotechnol. Adv.*, vol. 33, no. 1, pp. 41–52, 2015.

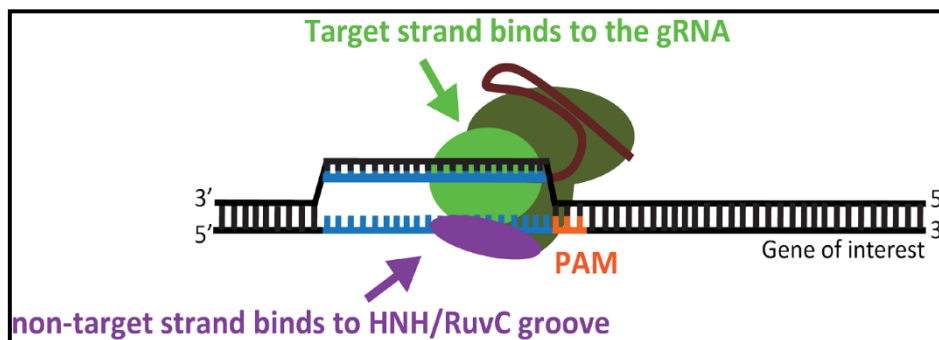


Figure 1 The representative image of RNA guided DNA cleavage by CRISPR/Cas9 system

Impact of crop diversification and low-input farming on soil microbial diversity

Impacto de la diversificación de cultivos y prácticas de bajo impacto sobre la diversidad microbiológica

O. Özbolat*, M. Egea-Cortines, R. Zornoza

Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena Plaza del Hospital s/n 30202, Cartagena, Spain.
*onurcan.ozbolat@upct.es

Abstract

Microbial community existing in soil ecosystems is a major indicator of soil quality. Microorganisms in soil provide and/or contribute major biogeochemical cycles of carbon and nitrogen. They shape soil characteristics physically and chemically along with providing for Nitrogen, Sulphur, Phosphate and other nutritional cycles in agricultural areas locally. This project focuses on determination of soil microbiome community as the types of species existing and the abundance of each species through next-generation sequencing of 16S ribosomal metagenomic DNA from different agricultural areas. The overall data will provide a vast range of information of soil microbial community structure and the effect of different agricultural practices on community structure.

Keywords: Metagenomics; soil microbiome; next-generation sequencing; 16S ribosomal DNA.

Resumen

Las comunidades microbianas existen en los ecosistemas de suelo y son indicadoras de su calidad. Los microorganismos en el suelo, proveen y contribuyen a los grandes ciclos geoquímicos del carbono y nitrógeno. Determinan las características físico-químicas y proveen de forma localizada de nitrógeno, sulfuro, fostato en la agricultura. El presente proyecto enfoca la determinación de comunidades microbiológicas, incluyendo especies y abundancia por medio de secuenciación de nueva generación de ADN de diferentes áreas agrícolas. Los datos generados van a dar una información muy amplia sobre las comunidades microbianas del suelo y el impacto de diferentes prácticas agrícolas sobre su estructura.

Palabras clave: Metagenómica, microbioma del suelo, secuenciación de nueva generación, 16S.

1. INTRODUCTION

Soil quality has been defined as “the capacity of a soil to function, within the limits imposed by the ecosystem, to preserve the biological productivity and environmental quality, and promote plant, animal and human health” [1]. Microorganisms living in soil are abundant and highly diverse. These microorganisms are the key players of many soil functions such as biogeochemical cycling, plant productivity or climate regulation and are essential for the integrity of terrestrial ecosystems. The environmental pressure on soil are often related to human activities and diminishingly decreasing the overall quality and sustainability of soil in both agricultural and forest ecosystems [2]–[4].

Soils represent the most diverse and important ecosystem on the planet. Most of the biodiversity of agroecosystems found in the soil, and the functions performed by soil biota have considerable direct and indirect effects on crop growth and quality, nutrient cycle quality and the sustainability of soil productivity [5], [6]. Soil quality is considered as an integrative indicator of environmental quality, food security and economic viability. The living community of soils, especially the microbial community, is evaluated as high importance in sustainable agricultural production and the conservation of major ecological cycles. Therefore, soil is accepted as an indicator for monitoring land management and quality assessments in relation with agricultural practices. The use of microbial community structure and diversity as an indicator to monitor soil quality is both challenging due to lack of understanding of community structure and soil function, and very promising due to direct correlation of major nutrient cycles related to agricultural processes and soil microbial community [7], [8]. Soil biota also contributes directly and indirectly to the resistance and resilience of agroecosystems to abiotic disturbances and stress factors such as nutritional chemicals, anthropogenic, climatological and hydrological disturbances. Microbial community present in the soil are the most sensitive and rapid indicators of perturbations and land use changes. In this manner, quantitative identification of microbial community structure and naturally the diversity of microbiota has become great interest as one of the strongest tools for soil quality evaluation [9]–[11]

Agricultural land management is one of the most significant activity to alter soil characteristics in physical, chemical, and biological properties. This fact is particularly relevant in regions such as Mediterranean, where climate with land management can easily lead increased rates of erosion and other degradation processes of agricultural land due to arid seasons etc. These issues may can lead to loss of soil fertility and reduction in the diversity and abundance of soil microorganisms [12]–[14]. Agricultural practices alter the soil microbial community in many ways. Chemical treatments through pesticides and herbicides along with tillage are some of the negative effects on soil microbial community structure and function. On the other hand, some organic fertilisers and other repeated application of manures may lead increased soil microbial community function [14]–[18].

Given the crucial importance of diversity and abundance of soil microbiota, there are several techniques to assess community structure profile. One of the most effective technique rely on DNA sequencing technology where specific amplicons selected within the bacterial genome and sequenced through high-throughput next-generation sequencing to identify and quantify bacterial community in metagenomic samples. Sequencing 16S ribosomal DNA of metagenomic soil samples considered as the ultimate assay to obtain community structure data in soils. Different DNA fragments within 16S ribosomal DNA of bacteria are hypervariable regions meaning that the specific sequences are greatly vary through species and it allows the differentiation between different species in soil and their abundancy through sequencing data and bioinformatics analysis of data [19]–[21].

2. MATERIALS AND METHODS

Quantitative and qualitative analysis of soil microbial community structure will be performed in two different experimental set-up as following:

- Above-ground (agricultural products) biodiversity is increased by planting vetch and barley between mandarin trees to evaluate how the increased biodiversity of agricultural products affects below-ground biodiversity (microorganisms present in soil).
- Long term practices such as conventional farms, organic farms and biodynamic farms has been handled in specific farms in Murcia/Spain. The effect of different agricultural practices will be influencing the soil microbial biodiversity and abundance. The samples from different farms will be analysed to conclude the overall effect.

2.1. Sampling

The samples were collected from 0-10 cm from the soil surface and immediately put on ice to be transferred to -20°C to be stored until DNA extraction.

2.2. DNA extraction

The genomic DNA from soil samples will be extracted by using DNeasy PowerSoil Kit (QIAGEN)

2.3. Target Selection

The amplification of 16S ribosomal DNA regions will be carried out by using commercial kit Ion 16S™ Metagenomics Kit (ThermoFisher). The process will yield amplicons which will be used to identify microbial community based on sequencing data.

2.4. Screening of Amplicons

Identification of isolated and selected DNA sample will be performed by using Agilent 2100 Bioanalyzer system in competence with Agilent High Sensitivity DNA kit and suitable chips. The analysis allows to differentiate different DNA samples by size and calculating their concentrations.

2.5. Library construction

The library construction is done to anneal sequencing adaptors to DNA samples along with a barcoding process. DNA barcodes allow pooling samples in a single chip to be sequenced to be identified further in bioinformatics studies according to specific barcode sequences embedded to each sample. Library preparation will be carried out by using Ion Xpress Plus Fragment Library Kit. DNA barcoding will be carried out by using Ion Xpress™ Barcode Adapters 1–16.

2.6. Template preparation

The templates are the ultimate clonally amplified DNA samples to be sequenced. The system works as an emulsion PCR method for clonal amplification of prepared library by using Ion OneTouch™ 2 instrument and suitable Ion PGM™ Hi-Q View OT2 Kit.

2.7. Sequencing

Sequencing process will be carried out by using Ion Torrent PGM™ (ThermoFisher) by using suitable Ion PGM™ Hi-Q View Sequencing Kit and Ion 314™ Chip kit.

2.8. Physical and chemical soil properties

Fluorometric microplate method for enzyme assays and conventional physical and chemical soil properties by a common procedure to be delivered as Handbook in the Diverfarming project (www.diverfarming.eu), where this thesis is implemented.

3. ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis is carried out in correlation with Plant Biotechnology Institute, Cartagena and Polytechnic University of Cartagena, Cartagena. Diverfarming Project is funded by European Union (H2020 project).

4. REFERENCES

- [1] *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. Madison, WI: Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, 1994.
- [2] J. Gans, M. Wolinsky, and J. Dunbar, "Microbiology: Computational improvements reveal great bacterial diversity and high toxicity in soil," *Science (80-)*, vol. 309, no. 5739, pp. 1387–1390, 2005.
- [3] T. P. Curtis, W. T. Sloan, and J. W. Scannell, "Estimating prokaryotic diversity and its limits," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 99, no. 16, pp. 10494–10499, 2002.
- [4] R. E. Creamer *et al.*, "Implications of the proposed Soil Framework Directive on agricultural systems in Atlantic Europe - a review," *Soil Use and Management*, vol. 26, no. 3, pp. 198–211, 2010.
- [5] J. Roger-Estrade, C. Anger, M. Bertrand, and G. Richard, "Tillage and soil ecology: Partners for sustainable agriculture," *Soil and Tillage Research*, vol. 111, no. 1, pp. 33–40, 2010.
- [6] I. M. Young and J. W. Crawford, "Interactions and self-organization in the soil-microbe complex," *Science*, vol. 304, no. 5677, pp. 1634–1637, 2004.
- [7] M. Schloter, P. Nannipieri, S. J. Sørensen, and J. D. Van Elsas, "Microbial indicators for soil quality," pp. 1–10, 2018.
- [8] S. K. Sharma *et al.*, "Microbial Community Structure and Diversity as Indicators for Evaluating Soil Quality," in *Biodiversity, Biofuels, Agroforestry and Conservation Agriculture*, vol. 5, 2011, pp. 317–358.
- [9] P. Lavelle *et al.*, "Soil ecosystem services and land use in the rapidly changing orinoco river basin of colombia," *Agric. Ecosyst. Environ.*, vol. 185, pp. 106–117, 2014.
- [10] L. Zelles, "Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: A review," *Biology and Fertility of Soils*, vol. 29, no. 2, pp. 111–129, 1999.
- [11] R. Zornoza, C. Guerrero, J. Mataix-Solera, K. M. Scow, V. Arcenegui, and J. Mataix-Beneyto, "Changes in soil microbial community structure following the abandonment of agricultural terraces in mountainous areas of Eastern Spain," *Appl. Soil Ecol.*, vol. 42, no. 3, pp. 315–323, Jul. 2009.
- [12] K. Jangid *et al.*, "Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems," *Soil Biol. Biochem.*, vol. 40, no. 11, pp. 2843–2853, 2008.
- [13] F. Caravaca, G. Masciandaro, and B. Ceccanti, "Land use in relation to soil chemical and biochemical properties in a semiarid Mediterranean environment," *Soil Tillage Res.*, vol. 68, no. 1, pp. 23–30, 2002.
- [14] F. García-Orenes, A. Morugán-Coronado, R. Zornoza, and K. Scow, "Changes in Soil Microbial Community Structure Influenced by Agricultural Management Practices in a Mediterranean Agro-Ecosystem," *PLoS One*, vol. 8, no. 11, p. e80522, Nov. 2013.
- [15] B. T. Christensen, "Matching measurable soil organic matter fractions with conceptual pools in simulation models of carbon turnover: revision of model structure," *Eval. soil Org. matter Model.*, vol. I, pp. 143–159, 1996.
- [16] M. E. Pampulha and A. Oliveira, "Impact of an Herbicide Combination of Bromoxynil and Prosulfuron on Soil Microorganisms," *Curr. Microbiol.*, vol. 53, no. 3, pp. 238–243, 2006.
- [17] Y. Feng, A. C. Motta, D. W. Reeves, C. H. Burmester, E. van Santen, and J. A. Osborne, "Soil microbial communities under conventional-till and no-till continuous cotton systems," *Soil Biol. Biochem.*, vol. 35, no. 12, pp. 1693–1703, 2003.
- [18] S. D. Frey, E. T. Elliott, and K. Paustian, "Bacterial and fungal abundance and biomass in conventional and no-tillage agroecosystems along two climatic gradients," *Soil Biol. Biochem.*, vol. 31, no. 4, pp. 573–585, 1999.
- [19] V. Lakshmanan, G. Selvaraj, and H. P. Bais, "Functional Soil Microbiome: Belowground Solutions to an Aboveground Problem," *PLANT Physiol.*, vol. 166, no. 2, pp. 689–700, 2014.
- [20] O. Morozova and M. A. Marra, "Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics," *Genomics*, vol. 92, no. 5, pp. 255–264, 2008.
- [21] S. J. Finley, M. E. Benbow, and G. T. Javan, "Potential applications of soil microbial ecology and next-generation sequencing in criminal investigations," *Applied Soil Ecology*, vol. 88, pp. 69–78, 2015.