



ETSIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica

Proceedings of the 5th WORKSHOP ON AGRI-FOOD RESEARCH



WiA:16



Universidad Politécnica de Cartagena

5th Workshop on Agri-food Research-WiA.16. Cartagena, Murcia, Spain. 9-10 May 2016

Proceedings of the 5th WORKSHOP ON AGRI-FOOD RESEARCH

Editores y Comité Científico Organizador

Dr. Francisco Artés-Hernández

Dr. Juan Antonio Fernández-Hernández

Dr. Javier Calatrava

Dra. Encarna Aguayo

Dr. Juan José Alarcón

Dr. José Enrique Cos

Programa de doctorado en Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (TAIDA). Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica (ETSIA). Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT) .

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) .

<http://taidaa.upct.es/>

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.

© 2016, Francisco Artés-Hernández, Juan Antonio Fernández-Hernández, Javier Calatrava, Encarna Aguayo, Juan José Alarcón y José Enrique Cos (editores y comité organizador)

© 2016, Programa de doctorado en Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario. TAIDA, UPCT. <http://taida.upct.es/>

© 2016, Universidad Politécnica de Cartagena.

CRAI Biblioteca
Plaza del Hospital, 1
30202 Cartagena
968325908
ediciones@upct.es

Primera edición, 2017

ISBN: 978-84-16325-29-0

© Imagen de la cubierta: elaboración del autor



Esta obra está bajo una licencia de Reconocimiento-NO comercial-Sin Obra Derivada (by-nc-nd): no se permite el uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>

Preface

As Convener of the Organizing and Scientific Committee of the 5th Workshop on Agri-Food Research (WIA.16) 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 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: Agrifood Biotechnology, Food Technology and Engineering, Plant Production Technology and Engineering and Agroforestry and Economy Engineering, depending on the topics of interest involved in our Program. We also had three general 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.

Francisco Artés-Hernández PhD
Convener of the 5th Workshop on Agri-Food Research (WIA.16)

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 2016 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 2016 Workshop, allowing the dissemination of its major achievements.

I would like to thank the organisers (the Committee of the TAIDA Program lead 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 Universidad Politécnica de Cartagena for their hard work, that has made it possible to organise a successful workshop. I encourage them all to continue to work in this way for the future.

Pablo Fernández-Escámez PhD
Director of the International Doctoral School
Universidad Politécnica de Cartagena

Preface

INDEX

Keynote speakers:

- **Interdisciplinary research in urban agriculture**

Dr. Francesco Orsini

12

Research Centre for Agriculture and Biodiversity in the Urban Environment (RESCUE-AB), Agricultural Sciences Dept., University of Bologna, Italy. FAO-UN consultant in urban agriculture Projects and has been involved in several EU projects: "Hortis", "Urban Green Train", "Urban Agriculture Europe" and "Urban Allotment Gardens in European Cities". (Bologna, Italy).

- **Agribusiness Entrepreneurship: IDAI NATURE**

D. Carlos Ledó Orriach

13

Agronomical Engineer. Chief Executive Officer of IDAE NATURE. Valencia, Spain. Among several awards obtained, the more relevant ones are Premio Nacional a la mejor iniciativa empresarial 2014; Premio Nacional CEPYME 2014

- **Publish or perish**

Dr. Pedro Martínez-Gómez

14

Scientific Researcher at the Department of Plant Breeding of CEBAS-CSIC, Murcia, Spain. Editor-in-Chief of Scientia Horticulturae and Member of the Editorial Board of the Elsevier PLANT Article Transfer Group (PLANT-ATS).

INDEX

ORAL SESSION I: Food Technology and Engineering	15
<i>Effect of heating rates on the thermal resistance of Cronobacter sakazakii DPC 6529</i>	16
<i>I. Gómez-Jódar, J.P. Huertas, A. Palop</i>	
<i>Health-promoting compounds and quality changes of a functional carrot smoothie during shelf life</i>	20
<i>A.C. Formica-Oliveira, G.B Martínez-Hernández, P. A. Gómez, E. Aguayo, F. Artés, F. Artés-Hernández</i>	
<i>Effect of shading on the content of vitamin C and E in tomato grown with different doses of nitrogen</i>	24
<i>V. Hernández, P. Hellín, J. Fenoll, P. Flores</i>	
<i>Evaluation of bacterial growth in a thermally treated smoothie</i>	28
<i>G.A. González-Tejedor, F. Artés-Hernández, P.S. Fernández</i>	
<i>Self cooling bag-in-box package and method of manufacturing the same</i>	32
<i>E. Hernández, A. López, A. Esnoz</i>	
<i>The false root-knot nematode Nacobbus aberrans modifies the level of phenylpropanoid compounds during infection of chilli pepper</i>	36
<i>N. López-Martínez, J.P. Fernández-Trujillo, M. Biesaga, E. Zavaleta-Mejía</i>	
<i>Antibrowning washing agents effect to preserve quality of minimally processed Vicia faba seeds</i>	40
<i>M. Otón, F. Artés, F. Artés-Hernández</i>	
<i>Seasonal effect on selected quality traits of a melon near-isogenic line</i>	44
<i>M. Zarid, J.P. Fernández-Trujillo</i>	
<i>Vitamin C and microbial quality of minimally fresh processed pea seeds stored in modified atmosphere packaging</i>	48
<i>E. Collado, E. Armero, F. Artés-Hernández, E. Aguayo, F. Artés, J.A. Fernández, P.A. Gómez</i>	
<i>Continuous microwaving of an orange smoothie inhibits detrimental enzyme activity</i>	52
<i>M. Arjmandi, M. Otón, P. Gómez, F. Artés-Hernández, F. Artés, E. Aguayo</i>	
ORAL SESSION II: Agrifood Biotechnology	56
<i>Economic sensitivity analysis on the profitability of production of rabbit meat</i>	57
<i>A. Martínez-Bas, E. Armero, M. Kessler</i>	
<i>Influence of climatic conditions on volatile emission in snapdragon (Antirrhinum majus)</i>	61
<i>M.I. Terry, J. Weiss, M. Egea Cortines</i>	
<i>Circadian emission of main volatile compounds in Antirrhinum majus</i>	65
<i>V. Ruiz-Hernández, J. Weiss, M. Egea-Cortines</i>	
<i>Role of molecular markers in environmental studies on the example of the endangered species Cistus heterophyllus</i>	69
<i>M. Pawluczyk, J. Weiss, M. Egea-Cortines</i>	
<i>Genetic and environmental effects on the phenotypic structure of Antirrhinum</i>	73
<i>R. Alcantud, J. Weiss, M. Egea-Cortines</i>	
<i>Effects of Pb⁺² on three populations of Zygodontium fabago: Genotoxicity study</i>	77
<i>A. López-Orenes, S. Silva, C. Santos, M.A. Ferrer, A.A. Calderón</i>	
<i>Effect of temperature during on in vitro multiplication of Limonium sinuatum</i>	81
<i>J. Sánchez, A.A. Calderón</i>	

ORAL SESSION III: Plant Production Technology and Engineering	85
<i>Dynamics of phosphorus in wetlands with different degree of eutrophication: experimental results in mesocosms</i>	86
<i>M.C. Tercero, J. Álvarez-Rogel, M.N. González-Alcaraz</i>	
<i>Selection of a resistance population of <i>Tuta absoluta</i> to emamectin benzoate</i>	90
<i>M.R. Martínez-Aguirre, L. García-Vidal, P. Bielza</i>	
<i>Does reclaimed water influence nitrogen and water use efficiency and the structural constituents of grapefruit trees?</i>	94
<i>C. Romero-Triqueros, P.A. Nortes, J.J. Alarcón, E. Nicolás</i>	
<i>Transforming an agricultural patch into a public green area. El Palmeral de Zairaiche (Murcia)</i>	98
<i>F. Medina, J. Ochoa</i>	
<i>Root ABA signalling in salinized tomato</i>	102
<i>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</i>	
<i>Variability of neonicotinoid tolerance in Mediterranean populations of <i>Orius laevigatus</i> (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae)</i>	106
<i>V. Balanza, J.E. Mendoza, P. Bielza</i>	
<i>Nitrogen fertilizer recommendations for sweet pepper crop in greenhouses of Campo de Cartagena</i>	110
<i>J. Navarro, F.M. del Amor, J. Cánovas</i>	
<i>Advances in biomechanical consolidation of monumental <i>Ficus macrophylla</i> trees in San Francisco Square (Cartagena)</i>	114
<i>M.A. Guillén M. Gutiérrez, J. Ochoa</i>	
<i>Synergism studies with binary mixtures of pyrethroid, carbamate and organophosphate insecticides on <i>Frankliniella occidentalis</i> (Pergande)</i>	118
<i>J. Abellán, P.J. Espinosa, V. Quinto, J. Contreras, P. Bielza</i>	
<i>Combined effects of deficit irrigation and crop level on early nectarine trees</i>	122
<i>J.M. de la Rosa, M.R. Conesa, R. Domingo, E. Aguayo, N. Falagán, A. Pérez-Pastor</i>	
<i><i>Orius laevigatus</i> (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) microbial community and its involvement in non-prey feeding tolerance</i>	126
<i>J.E. Mendoza, V. Balanza, X. Chen, M.D. Hitchings, P.D. Facey, R. del Sol, P. Bielza</i>	
<i>Phenotypic variability and pathogenicity of different isolates of <i>Penicillium digitatum</i> and <i>P. italicum</i> obtained from lemon fruits (<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.)</i>	130
<i>M.A. Parra, J.A. Martínez</i>	
<i>Resistance to neonicotinoids in Spanish populations of <i>Myzus persicae</i> (Hemiptera: Aphididae)</i>	134
<i>A. Belando, I. Moreno, C. Grávalos, P. Bielza</i>	
<i>Baseline susceptibility of Mediterranean populations of <i>Trialeurodes vaporariorum</i> (Westwood) to cyantraniliprole</i>	138
<i>I. Moreno, A. Belando, C. Grávalos, P. Bielza</i>	
<i>Growth and yield of tomato crop under subsurface drip irrigation treated with different Trifluralin doses</i>	142
<i>F.J. Lucas, V. Martínez-Álvarez, M. Valiente</i>	
<i>Potential resistance to chlorantraniliprole in Mediterranean populations of <i>Tuta absoluta</i> (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)</i>	146
<i>L. García-Vidal, M.R. Martínez-Aguirre, P. Bielza</i>	
<i>Grafting of sweet pepper against to <i>Meloidogyne incognita</i> infestation: Physiological response</i>	150
<i>A. Gálvez, A. Lacasa, C. Ros, F.M. del Amor, J. López-Marín</i>	

Comparison of potential irrigation strategies to confront water restriction period of yield and fruit quality in lemon tree	154
<i>J.M. Robles, J.G. Pérez-Pérez, P. Botía</i>	
ORAL SESSION IV: Agroforestry and Economy Engineering	158
Crop coefficients parameterization using remote sensing in basin-scale hydrological modelling	159
<i>J.E. Hunink, J.P.C. Eekhout, J. de Vente, S. Contreras, P. Droogers, A. Baille</i>	
Estimating evapotranspiration in the Segura River Basin from remote sensing data	163
<i>J.A. Martínez-Pérez, S. García-Galiano, A. Baille</i>	
Maintenance cost analysis of the Historic Garden “El Huerto de las Bolas”	167
<i>S. Gómez, P. Satoca, F.J. Alcón</i>	
Configuration and specifications of an unmanned aerial vehicle for precision viticulture	171
<i>M. Erena, S. García-Galiano</i>	
Viability of an agro-climatic station with SCADA system and M2M communication	175
<i>J.M. González-Esquivá, A. Ruiz-Canales, G. Garcia-Mateos, J.M. Molina-Martínez</i>	
Poster Session: Food Technology and Engineering	179
Innovative development of green smoothies by emerging minimal processing technologies	180
<i>N. Castillejo, F. Artés, F. Artés-Hernández</i>	
Puree-based vegetables beverages development under innovative minimal processing techniques	184
<i>T.V. Klug, F. Artés, F. Artés-Hernández</i>	
Functionality of a watermelon juice enriched with L-citrulline: technical development and effect in vivo	188
<i>B. Fernández-Lobato, A. Martínez-Sánchez, E. Aguayo</i>	
Effect of different technologies (conventional thermal treatment, microwave...) and stress conditions (acid shock) on <i>Listeria monocytogenes</i> in food	192
<i>J.A. Sotomayor, A. Iguaz, P.M. Periago</i>	
Poster Session: Agrifood Biotechnology	196
Genetic and molecular analysis of <i>Gigantea</i>, a gene involved in adaptation to climate via regulation of the circadian clock in <i>Solanaceae</i>	197
<i>C. Brandoli, J. Weiss, M. Egea-Cortines</i>	
Peach breeding (<i>Prunus persica</i> L.): Agronomic evaluation of selections IMIDA - NOVAMED	201
<i>A. Guevara, A. Carrillo, F. García, D. López, M.B. Lopez, J. Cos.</i>	
Genotyping, phenotyping and transcriptomic analysis of accessions of <i>Vicia faba</i>, <i>Pisum sativum</i> and <i>Vigna unguiculata</i>	205
<i>M. Martos-Fuentes, J. Weiss, C. Egea-Gilabert, M. Egea-Cortines, J.A. Fernández</i>	
Development of software tools to control an artificial vision-based phenotyping system	209
<i>F. Pérez Sanz, J. Weiss, M. Egea-Cortines, P.J. Navarro</i>	
Poster Session: Plant Production Technology and Engineering	213
Deficit irrigation automation assessment in cherry tree. Improve of irrigation management to ensuring productivity and sustainability	214
<i>V. Blanco, R. Domingo, A. Pérez Pastor</i>	

The combined used of tree species and biochar amendments for the phytomanagement of mine tailings under semiarid climate

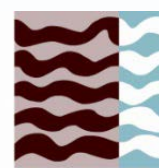
218

D. Martínez-Oró, I. Párraga-Aguado, H.M. Conesa

Organizers



Universidad
Politécnica
de Cartagena



ETSIA
Escuela Técnica
Superior de
Ingeniería
Agronómica

Collaborators



Grupo
G's España

idainature 

 Cosemar Ozono


37 38
CAMPUS MARE NOSTRUM


Instituto de
Biotecnología
Vegetal
Universidad Politécnica de Cartagena



Keynote speakers

Interdisciplinary research in urban agriculture

F. Orsini^{*}, G. Gianquinto

Research Centre on the urban environment for agriculture and biodiversity (RESCUE-AB), Agricultural Sciences Department, Bologna University Alma Mater Studiorum, Viale Fanin, 44, 40127, Bologna, Italy.

Abstract

In recent years, due to the increasing relevance of urban agriculture in world cities, a number of researches addressing the different associated subjects have been conducted. When plants are grown inside cities, risks may arise in term of produce safety. On the other hand, reducing food miles may result in energy and cost saving, as well as promoting city resilience. Overall, urban agriculture may provide a substantial element for ensuring both adaptation and reduction of climate change effects. Plants promote microclimate regulation and improve air quality. When green structures are integrated in building, they may reduce thermal conditioning costs, as well as provide noise barriers. On the other hand, highly dense urban fabric may lead to experiment cultivation in spaces that have not previously meant for hosting plants, e.g. rooftop greenhouses or artificially illuminated indoor environments. Urban green infrastructures, moreover, may improve building and neighborhood property values, and the wide recognition of the economic role played by urban agriculture in today's cities has promoted the growth and diversification of different associated business models. From a social perspective, urban gardens are commonly promoted by municipalities for their positive effects on community building and social inclusion. Furthermore, when urban gardens are properly managed and distributed within the city, they may preserve and promote urban biodiversity. At RESCUE-AB, research addresses the different elements of urban agriculture, aiming at understanding and promoting sustainable cultivation in cities.

Keywords: Urban green infrastructure; Urban Horticulture; Vegetables; Life Cycle Analysis (LCA); Heavy metals

* E-mail: f.orsini@unibo.it

Agribusiness Entrepreneurship

Emprendedurismo en el sector agroalimentario

C. Ledó Orriach*

Chief Executive Officer IDAI NATURE. Valencia, Spain. <http://www.idainature.com/>

Abstract

After considering whether there is food safety for the consumer and if we were worrying about chemical residues in fresh produce it is highlighted the need to undertake research of Bioinsecticides botanical extracts that enable farmers to offer supermarkets fruits and vegetables without chemical residues at the same price as conventional. In this context, it is considered that the keys to be taken are: adequate and multidisciplinary training; personal motivation and culture of effort; willingness to improve and change the world into something better, leaving positive imprints; something fundamental is to surround yourself with a good team where there is genuine passion for what is being done; always keep in mind that a company can never give back to society; self-confidence; leadership skills and team management; honesty and professional ethics in the market.

Keywords: Entrepreneurship; leadership; innovation; team work; creativity; passion.

Resumen

Tras plantear si existe la seguridad alimentaria para el consumidor y si éste se estaba preocupando de los residuos químicos que llevan los alimentos frescos que consumimos se pone de manifiesto la necesidad de emprender en la investigación de extractos botánicos Bioinsecticidas que permitan a los agricultores poder ofrecer a los supermercados frutas y verduras sin residuos químicos al mismo precio que las convencionales. En este contexto se considera que las claves para emprender son: una formación adecuada y multidisciplinar; motivación personal y cultura del esfuerzo; deseo de mejorar y cambiar en algo el mundo en el que vivimos dejando en la medida de lo posible huellas positivas; rodearse de un buen equipo de trabajo donde haya genuina pasión por lo que se hace; tener siempre presente que una empresa jamás puede vivir de espaldas a la sociedad de la que forma parte; confianza en uno mismo; capacidad de liderazgo y de gestión de equipos y ética profesional y honestidad en el mercado.

Palabras clave: Emprendimiento; liderazgo; innovación; trabajo; equipo; creatividad; pasión.

* E-mail: cledo@idainature.com

Publish or Perish

Publicar o morir

P. Martínez-Gómez*

Scientific Researcher at the Department of Plant Breeding of CEBAS-CSIC, Murcia, Spain. Editor-in-Chief of *Scientia Horticulturae* and Member of the Editorial Board of the *Elsevier PLANT Article Transfer Group* (PLANT-ATS)

Abstract

The Organized Scepticism associated to the Peer Review is one of the main pillars for the research activity. It is necessary the publication of results with enough guaranties to researchers and society. But this is not all in science. "Publish or perish" is a very famous sentence to describe the pressure to rapidly and continually publish scientific works to sustain research career, i.e. salary, founs, fellows, etc. This pressure has been materialized in the metrication of publication mainly due to the continuous increase of publication number and the need of fast and quantifiable results to support the research programs. However, paradoxically, this pressure should produce a reduction of the publication quality, application and impact. In this seminar the different tools for evaluation of publication metric and impact will be discussed. In addition, a re-evaluation of these publication metrics will be proposed in order to maximize the benefits to Society. Finally, the changing Journal landscape will be also discussed with special emphasis in the open access publication and its impact.

Keyword: Organized Scepticism; Peer Review; Publication Metric; Publication Impact; Journal Landscape; Open Access Publishing.

Resumen

El escepticismo organizado asociado a la revisión por pares es uno de los principales pilares de la actividad investigadora. Es necesaria la publicación de los resultados con suficientes garantías para los investigadores y para la sociedad. Pero esto no los es todo en ciencia. "Publicar o Morir" es una frase muy conocida para describir la presión para publicar trabajos científicos de forma rápida y continua para sostener la carrera investigadora, es decir, salario, proyectos, becas, etc. Esta presión se ha materializado en un sistema de metrización de las publicaciones debido principalmente al continuo aumento del número de publicaciones y la necesidad de obtener resultados rápidos y cuantificables para apoyar los programas de investigación. Sin embargo, paradójicamente, esta presión puede producir una reducción de la calidad de la publicación, su aplicación e impacto. En este seminario se discutirán las diferentes herramientas para la evaluación métrica y del impacto de las publicaciones. Además, se propondrá una nueva evaluación de estas métricas de publicación con el fin de maximizar los beneficios para la Sociedad. Por último, el cambiante panorama de las revistas también será discutido con especial énfasis en la publicación en abierto y su impacto.

Palabras clave: Escepticismo Organizado; Revisión por Pares; Metrización de las Publicaciones; Impacto de las Publicaciones; Perfil de las Revistas; Publicación en Abierto.

* E-mail: pmartinez@cebas.csic.es



ORAL SESSION I
Food Technology and
Engineering

Effect of heating rates on the thermal resistance of *Cronobacter sakazakii* DPC 6529

Efecto de la velocidad de calentamiento en la termorresistencia de *Cronobacter sakazakii* DPC 6529

I. Gómez-Jódar*, J.P. Huertas, A. Palop

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

Abstract

***Cronobacter sakazakii* is an opportunistic pathogen causing meningitis, septicemia and enterocolitis in neonates and it is usually related to the consumption of contaminated Powdered Infant Formula (PIF). Industrial thermal treatments involve three distinct stages: heating, holding and cooling, and all three stages may contribute to the microbial inactivation. In this study the effect of heating rates on the inactivation of *C. sakazakii* DPC 6529 was determined and the results showed that *C. sakazakii* presents an unusual behavior under non-isothermal treatments compared to the behavior of other non-spore-forming microorganisms.**

Keywords: *Cronobacter sakazakii*; heat resistance; powdered Infant Formula; non-isothermal treatments.

Resumen

***Cronobacter sakazakii* es un patógeno oportunista que causa meningitis, septicemia y enterocolitis en neonatos. Está frecuentemente relacionado con el consumo de fórmula infantil en polvo. Los tratamientos térmicos industriales consisten en tres etapas diferentes: calentamiento, mantenimiento y enfriamiento, y todas ellas contribuyen a la inactivación microbiana. En este estudio el efecto de la velocidad de calentamiento sobre la inactivación de *C. sakazakii* DPC 6529 fue determinado y los resultados mostraron que *C. sakazakii* presenta un comportamiento inusual bajo tratamientos no isotérmicos comparado con el comportamiento de otros microorganismos no formadores de esporas.**

Palabras clave: *Cronobacter sakazakii*; resistencia térmica; fórmula infantil en polvo; tratamientos no isotérmicos.

1. INTRODUCTION

Cronobacter sakazakii is a Gram-negative and ubiquitous enterobacteria [1]. It is considered an opportunistic pathogen whose major risk group are preterm, low-birth-weight or immune-compromised infants. Outbreaks of this microorganism have been epidemiologically linked to the

* E-mail: igj1@alu.upct.es

consumption of Powdered Infant Formula (PIF). PIF is considered a non-sterile product, and after its reconstitution could be considered a rich medium which allows bacterial growth.

C. sakazakii has been proposed to have one of the highest thermal resistances among the members of the *Enterobacteriaceae* family [2]. Several studies have been done on calculating the thermal resistance of this microorganism, among variety of strains and on different heating media, under isothermal conditions [3]. However, industrial thermal treatments involve three distinct stages: heating, holding and cooling, and all three stages may contribute to the microbial inactivation. There are no studies on the effect of heating rates and the behaviour of *C. sakazakii* under non-isothermal conditions. This poses the study of the microbial inactivation kinetics under non-isothermal conditions in order to obtain results under more realistic situations [4, 5].

The aim of this study was to determine the effect of heating rates and complete thermal treatments on the inactivation of *C. sakazakii* DPC 6529, to compare the thermal resistance values obtained under isothermal treatments conditions with those obtained from the non-isothermal results, in Peptone Water (PW) and PIF.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Bacterial strain and culture conditions

Cronobacter sakazakii DPC 6529 used in this study was obtained from the University College Cork culture collection. The culture was routinely grown overnight (~16 h) at 37 °C in Luria-Bertani broth (LB).

2.2 Heat resistance determinations

Heat resistance determinations were performed in a thermoresistometer Mastia [4]. The isothermal heat treatments were performed at 58 and 62°C. The non-isothermal treatments were performed at constant heating rates, 1 °C/min and 20 °C/min. Furthermore, more complex heat treatments (heating, holding and cooling periods) were also performed at a heating rate of 30 °C/min. The heating media used were Peptone Water (PW) and Powdered Infant Formula (PIF). Once the treatment temperature was reached and stable, the medium was inoculated with 0.2 mL of the culture suspension. Samples were collected into sterile test tubes at preset intervals, immediately diluted, plated in LB agar and incubated at 37 °C for 24 h.

2.3 Heat resistance data analysis

The isothermal inactivation processes have been described using the cumulative form of the Weibull distribution [6]. The behaviour of the microorganism under non-isothermal heat treatments was described with the model proposed for the description of dynamic inactivation processes, based also in the Weibull distribution [7].

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Isothermal resistance of *Cronobacter sakazakii* DPC 6529

The survival curves obtained in both heating media were non-linear for all the tested temperatures, showing the presence of tails. Moreover, the *p* values of the Weibull model obtained were below 1 (Table 1), supporting the tailing phenomenon. This phenomenon could be due to the rapid inactivation of the weak members of the population and the ability of the remaining survivors to adapt to the applied lethal agent, becoming more resistant [8]. The results obtained showed that at a low treatment temperature the thermal resistance of *C. sakazakii* was higher in PIF than in PW while at a higher treatment temperature the thermal resistance of the microorganism was similar in both heating media. It has been reported that differences in the

thermal resistance of *C. sakazakii* can be due to differences in the composition of the heating media [9].

3.2 Determination of the thermal resistance and the effect of heating rates under non-isothermal treatments based on isothermal results

When predictions were done by using the estimated parameters under isothermal treatments (Table 1), it can be observed a difference between the predictions and the experimental data for both heating rates and for the complex thermal treatment (Figure 1). For both constant heating rates, experimental values were above the predictions. However, for the complex treatment, they were below the predictions (Figure 1), which suggest that there is no clear effect of the heating rates on the thermal inactivation of *C. sakazakii*. These results are in disagreement with those of other authors, who found that higher heating rates led to faster inactivation of vegetative cells [4, 5, 10]. The different behaviour among bacterial species exposed to different heating rates could depend on how microbial cells respond to the effect of the heating rates. It has been reported that at slow heating rates the bacterial cell has time to prepare itself to the challenge and survive, probably due to the induction and expression of Heat Shock Response (HSR) genes and proteins [10].

4. CONCLUSIONS

Under non-isothermal treatments, the heating rates do not have a clear effect on the inactivation of *C. sakazakii* DPC 6529. This microorganism showed an usual stress response to thermal treatments. Under complete thermal treatments, the results suggest that the unusual thermal stress response of *C. sakazakii* could subserve this microorganism to survive to complex thermal treatments, such as pasteurization.

5. ACKNOWLEDGMENTS

This research has been possible thanks to the financial support provided by the Ministry of Science and Technology of the Spanish Government and the European Regional Development Fund (ERDF) through Project AGL-2013-48993-C2-1-R.

6. REFERENCES

- [1] Norberg, S., Stanton, C., Ross, R.P., Hill, C., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D. (2012). *Cronobacter* spp. in powdered infant formula. *J. Food Protect.* 75, 607–620.
- [2] Dancer, G.I., Mah, J.H., Rhee, M.S., Hwang, I.G., Kang, D.H. (2009). Resistance of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) to environmental stresses. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1606–1614.
- [3] Huertas, J.P., Álvarez-Ordóñez, A., Morrisey, R., Ros-Chumillas, M., Esteban, M.D., Maté, J., Palop, A., Hill, C. (2015a). Heat resistance of *Cronobacter sakazakii* DPC 6529 and its behaviour in reconstituted powdered infant formula. *Food Res. Int.* 69, 401–409.
- [4] Conesa, R., Andreu, S., Fernández, P.S., Esnoz, A., Palop, A. (2009). Nonisothermal heat resistance determinations with the thermoresistometer Mastia. *J. Appl. Microbiol.* 107, 506–513.
- [5] Huertas, J.P., Ros-Chumillas, M., Esteban, M.D., Esnoz, A., Palop, A. (2015b) Determination of thermal inactivation kinetics by the multipoint method in a pilot plant tubular heat exchanger. *Food Bioprocess Tech.* 8, 1543–1551.
- [6] Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguerinel, I. (2002). On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *Int. J. Food Microbiol.* 72, 107–113.
- [7] Van Zuijlen, A., Periago, P.M., Amézquita, A., Palop, A., Brul, S., Fernández, P.S. (2010). Characterization of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores; putative indicator microorganism for optimization of thermal processes in food sterilization. *Food Res. Int.* 43, 1895–1901.

[8] Van Boekel, M.A.J.S. (2002). On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *Int. J. Food Microbiol.* 74, 139–159.

[9] Gurlter, J.B., Kormnacki, J.L., Beuchat, L.R. (2005). *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. *Int. Food Microbiol.* 104, 1–34.

[10] Valdramidis, V.P., Geeraerd, A.H., Bernaerts, K., Van Impe, J.F. (2006). Microbial dynamics versus mathematical model dynamics: the case of microbial heat resistance induction. *Innov. Food Sci. Emerg.* 7, 80–87.

Tables and Figures

Table 1. Heat resistance values of *Cronobacter sakazakii* DPC 6529 obtained under isothermal treatments in Peptone Water (PW) and Powdered Infant Formula (PIF), derived from the Weibull model.

	δ_{60}		Z		P		RMSE
	estimate	std	estimate	std	estimate	std	
PW	0.09	0.02	4.72	0.23	0.76	0.08	0.51
PIF	0.10	0.01	3.98	0.10	0.68	0.04	0.32

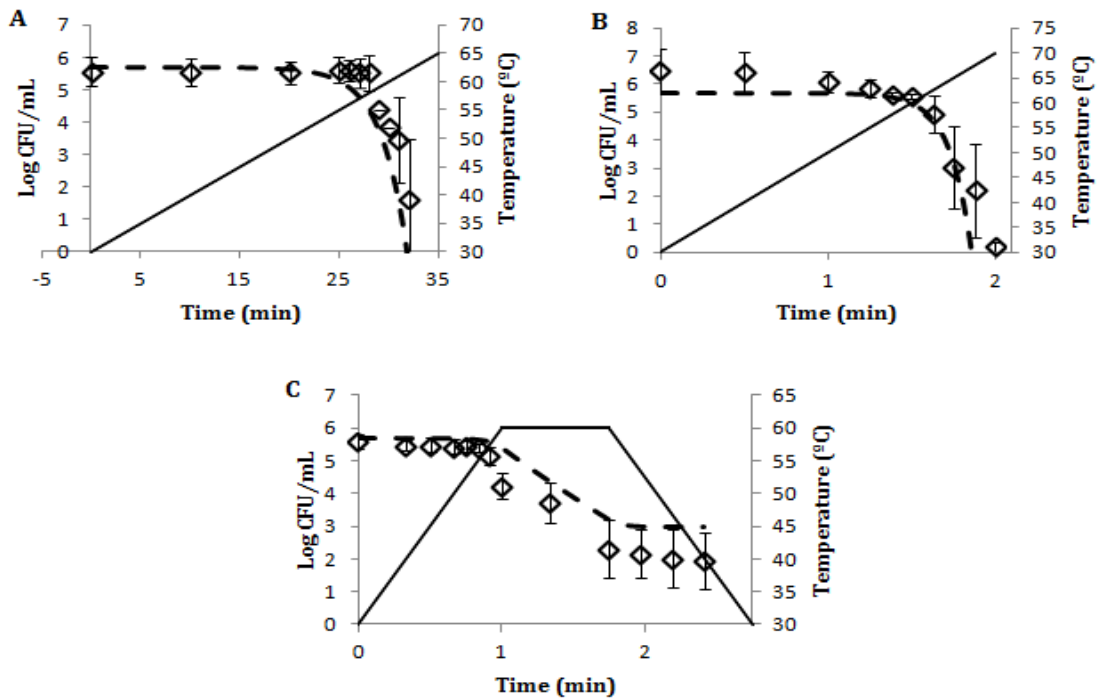


Figure 1. Effect on the heating rate on the survival of *Cronobacter sakazakii* DPC 6529 in Powdered Infant Formula. Experimental results (\diamond), Weibull model predictions based on the isothermal data (dashed lines), and temperature (continuous lines). At 1 °C/min (A), 20 °C/min (B) and complete thermal treatment at 30 °C/min (C).

Evolución de compuestos bioactivos y de la calidad de un smoothie funcional de zanahoria durante su vida comercial

Health-promoting compounds and quality changes of a functional carrot smoothie during shelf life

A.C. Formica-Oliveira*¹, G.B Martínez-Hernández^{1,2}, P.A. Gómez², E. Aguayo^{1,2}, F. Artés^{1,2}, F. Artés-Hernández^{1,2}

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

²Institute of Plant Biotechnology. UPCT. Campus Muralla del Mar. 30202 Cartagena, Murcia, Spain

Abstract

Carrots occupy the sixth place among the list of most consumed vegetables, although the content of the bioactive compounds phenolic acids is almost the lowest one. The phenolic/antioxidant levels of carrots may be greatly enhanced with a pre-enrichment incubation with different postharvest abiotic stresses. Accordingly, a functional carrot smoothie with phenolic /antioxidant-enriched levels was produced and its bioactive/physicochemical quality was monitored after 25 days at 5 °C. The total phenolics content from hyperoxia-preincubated carrot shreds was incremented up to 1000% after storage although other antioxidants compounds were reduced by 44%.

Keywords: bioactive compounds; abiotic stress; *Daucus carota*; functional food.

Resumen

Las zanahorias son la sexta verdura más consumida. Sin embargo, el contenido de los compuestos bioactivos fenólicos de las zanahorias no es muy alto. Los fenoles/antioxidantes de zanahorias pueden ser enormemente incrementados mediante diferentes estreses abióticos postcosecha. De esta forma, se preparó un *smoothie* funcional de zanahorias con altos niveles de fenoles/ antioxidantes y se estudiaron los cambios en su calidad bioactiva/fisicoquímica tras 25 días a 5 °C. Los compuestos fenólicos en los *smoothies* de zanahorias preincubadas en hiperoxia se incrementaron hasta un 1000% tras la conservación, aunque otros compuestos antioxidantes se redujeron en un 44%.

Palabras clave: compuestos bioactivos; estrés abiótico; *Daucus carota*; alimentos funcionales.

1. INTRODUCCIÓN

El consumidor actual está interesado en un estilo de vida saludable con alimentos con elevado aporte nutricional, propiedades beneficiosas para la salud y sin aditivos [1]. En este sentido, la demanda de *smoothies* de frutas y verduras ha crecido enormemente en los últimos

* E-mail: acfdo0@alu.upct.es

años debido a la creciente demanda de productos sanos y convenientes [2]. Los compuestos fenólicos, y específicamente los ácidos hidroxicinámicos, por su alta capacidad antioxidante son importantes para la prevención de estas enfermedades [3]. La actividad de la fenilalanina amonio liasa (PAL), enzima clave en la biosíntesis de compuestos fenólicos, se puede incrementar en respuesta a diferentes tipos de estreses de tipo biótico o abiótico [4]. Las zanahorias son la sexta verdura más consumida. Sin embargo, el contenido de compuestos fenólicos de las zanahorias no es muy alto [5]. De esta forma, el uso de diferentes estreses abióticos postcosecha, tales como cortado, radiación UV-C y conservación en atmósferas con hiperoxia, puede incrementar enormemente dicho contenido y el de otros antioxidantes. Además, el consumo de estas zanahorias enriquecidas en estos compuestos bioactivos se puede potenciar mediante una presentación de consumo como un *smoothie*.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar los cambios en compuestos fenólicos y antioxidantes, así como la calidad fisicoquímica durante la vida comercial refrigerada de smoothies de zanahoria funcionales preparados a partir de zanahorias ralladas pretratadas con diferentes estreses abióticos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

El material vegetal fueron zanahorias (*Daucus carota* cv. Nantesa) obtenidas de un supermercado cercano (Cartagena, España) en el mes de noviembre. El procesado consistió en un lavado (100 ppm NaOCl; pH=6,5; 5 °C), enjuagado (5 °C), secado y rallado con un procesador de verduras (FreshExpress+, Moulinex Ovatio, Francia). Tras el rallado se procedió a los pre-tratamientos y sucesiva incubación de las zanahorias ralladas.

2.2 Pre-tratamientos de estreses abióticos y preparación del *smoothie*

Las zanahorias ralladas fueron pre-tratadas con radiación UV-C (9 kJ m⁻²) mediante una mesa de radiación UV-C descrita previamente [6]. Zanahorias ralladas sin irradiar fueron utilizadas como control (CTRL). Posteriormente las muestras se incubaron durante 72 h a 15 °C en aire o hiperoxia (80 % O₂ balanceado con N₂). Tras el periodo de incubación se prepararon los *smoothies* con las zanahorias ralladas tratadas y agua de red (zanahoria:agua 1kg/1L) y se trataron a 80 °C durante 3 min. Finalmente, los *smoothies* se conservaron a 5 °C durante 25 días.

2.3 Calidad físico-química

Se determinó el pH, sólidos solubles totales (SST) y color. El pH se midió a través de un pH-metro automático (Basic 20, Crison, España). Los SST se midieron con un refractómetro (modelo N1, Atago, Japón) y se expresaron como °Brix. El color se determinó con un colorímetro tri-estímulo (Chroma Meter CR-300, Minolta, Japón) y se expresó en las coordenadas del sistema CIELab.

2.4 Determinación de fenoles totales (FT) y capacidad antioxidante total (CAT)

La extracción y análisis de FT y CAT se realizó de acuerdo a Martínez-Hernández *et al.*, [7]. Los FT se expresaron en mg ácido clorogénico equivalente (ChAE) 100 g fw⁻¹ y CAT en mg de Trolox equivalente (TE) kg fw⁻¹.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inicialmente, los *smoothies* presentaron un pH 6,1-6,4 y disminuyó a 4,3-4,6 tras 25 días de conservación (Tabla 1) debido al crecimiento de microorganismos, aunque el nivel de éstos fue inferior a 6 log UFC g⁻¹. Valores similares a los iniciales se encontraron previamente en zanahorias

MPF [8]. El SST inicial de las muestras (1,5 °Brix) se mantuvo constante durante toda la conservación. De acuerdo a estudios previos [8] se observó un descenso de la luminosidad del *smoothie* durante la conservación. Paralelamente, se observa un mantenimiento del color rojo y amarillo (a y b), en contraste con estudios previos en zanahoria MPF [8].

El contenido de FT de los *smoothies* de zanahorias pre-incubadas en aire no experimentaron grandes cambios durante la conservación (Figura 1). Sin embargo, los *smoothies* de zanahorias pre-incubadas en hiperoxia experimentaron unos incrementos de aproximadamente 1000% (CTRL+O₂) y 600% (UVc+O₂) respecto sus valores iniciales. La pre-incubación de zanahorias bajo hiperoxia conllevó a un estrés abiótico cuya activación de la PAL se observó sólo tras 25 días de conservación debido a la baja temperatura de conservación. El menor incrementó de síntesis de FT en las muestras UVc+O₂ puede deberse a un efecto inhibitorio sobre la actividad de PAL de las muestras irradiadas bajo las condiciones de alto oxígeno. El *smoothie* de zanahorias CTRL-Air presentó una CAT inicial de 43,63 mg TE 100 g fw⁻¹ que se incrementó en un 51% tras la conservación. Sin embargo, las muestras CTRL+O₂ experimentaron un descenso de la CAT del 44 % tras la conservación debido a la alta degradación de otros compuestos antioxidantes diferentes a los compuestos fenólicos. Los *smoothies* de zanahorias pre-tratadas con UV-C no experimentaron grandes cambios durante la conservación.

4. CONCLUSIONES

Los *smoothies* de zanahorias pre-enriquecidos en compuestos fenólicos mostraron una buena calidad fisicoquímica durante 25 días de conservación a 5 °C. La pre-incubación de zanahorias ralladas bajo condiciones de hiperoxia conllevó al descenso de un 44 % de compuestos antioxidantes del *smoothie* diferentes a los compuestos fenólicos. Sin embargo, esta pre-incubación de zanahorias ralladas en hiperoxia indujo grandes incrementos, del 600-100 %, de los compuestos fenólicos de los correspondientes *smoothies* tras la conservación.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ministerio de Economía y Competitividad Proyecto MINECO AGL2013-48830-C2-1-R la financiación recibida para este trabajo.

6. REFERENCIAS

- [1] Artés, F., Gómez, P., Aguayo, A., Escalona, V.H., Artés-Hernández, F. (2009). Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. *Postharvest Biol. Technol.* 51(3), 287-296.
- [2] Di Cagno, R., Minervini, G., Rizzello, C.G., De Angelis, M., Gobbetti, M. (2011). Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothie. *Food Microbiol.* 28 (5), 1062-1071
- [3] Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E. M., Garrido, J., Borges, F. (2013). Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. *Biomed. Res. Int.* 2013.
- [4] Cisneros-Zevallos, L. (2003). The use of controlled postharvest abiotic stresses as a tool for enhancing the nutraceutical Content and adding-value of fresh fruits and vegetables. *J. Food Sci.* 68, 1560-1565.
- [5] Chun, O. K., Kim, D.-O., Smith, N., Schroeder, D., Han, J. T., Lee, C. Y. (2005). Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. *J. Sci. Food Agric.* 85(10), 1715-1724.
- [6] Artés-Hernández, F., Escalona, V. H., Robles, P. A., Martínez-Hernández, G. B., Artés, F. (2009). Effect of UV-C radiation on quality of minimally processed spinach leaves. *J. Sci. Food Agric.* 89(3), 414-421.
- [7] Martínez-Hernández, G. B., Artés-Hernández, F., Gómez, P. A., Formica, A. C., Artés, F. (2013). Combination of electrolyzed water, UV-C and superatmospheric O₂ packaging for improving fresh-cut broccoli quality. *Postharvest Biol. Technol.* 76(0), 125-134.

[8] Cavalcante Fai, A. E., Alves de Souza, M. R., Vinhosa Bruno, N., Branco de Andrade Gonçalves, É. C. (2015). Produção de revestimento comestível à base de resíduo de frutas e hortaliças: aplicação em cenoura (*Daucus carota* L.) minimamente processada. *Scientia Agropecuaria* 6, 59-68.

Tabla 1. Caracterización físico-química de *smoothies* de zanahorias ralladas con diferentes pre-tratamientos durante 25 días de conservación a 5 °C (n=3).

Pre-tratamiento	pH		SST		L*		a		b	
	Día 0	Día 25	Día 0	Día 25	Día 0	Día 25	Día 0	Día 25	Día 0	Día 25
CTRL+Air	6,42	4,47	5,71	5,45	45,2	42,2	5,71	5,45	16,35	17,86
UV-C+Air	6,42	4,65	3,39	2,93	43,2	41,0	3,39	2,93	10,25	17,86
CTRL+O ₂	6,14	4,35	4,89	4,33	46,1	40,6	4,89	4,33	13,89	12,56
UV-C+O ₂	6,19	4,58	4,04	3,01	45,1	43,1	4,04	3,00	14,55	20,33

Tabla 2. Capacidad antioxidante total (mg TE 100 g fw⁻¹) de *smoothies* de zanahorias ralladas con diferentes pre-tratamientos durante 25 días de conservación a 5 °C (n=3±SE),

Pre-tratamiento	Día 0	Día 25
CTRL+Air	43,63±8,4	65,79±5,6
UV-C+Air	51,14±3,1	54,11±4,0
CTRL+O ₂	45,91±7,9	25,54±6,8
UV-C+O ₂	44,37±6,9	30,98±4,6

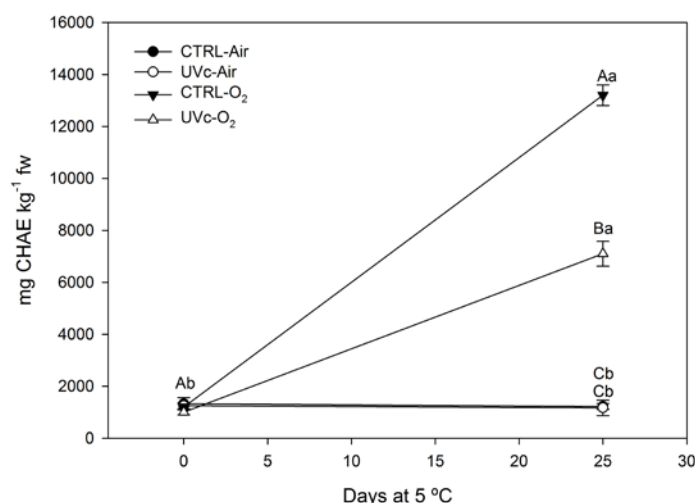


Figura 1. Contenido total de fenoles (mg CHAE 100 g fw⁻¹) de *smoothies* de zanahorias ralladas con diferentes pre-tratamientos durante 25 días de conservación a 5 °C (n=3±error estándar (SE)). Letras mayúsculas diferentes representan diferencias significativas (p < 0.05) entre tratamientos para el mismo día de muestreo. Letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas (p < 0.05) entre días de muestreo para el mismo tratamiento.

Effect of shading on the content of vitamin C and E in tomato grown with different doses of nitrogen

Efecto del sombreado sobre el contenido de vitamina C y E en tomate cultivados con diferentes dosis de nitrógeno

V. Hernández*, P. Hellín, J. Fenoll, P. Flores

Sostenibilidad y Calidad de Productos Hortofrutícolas. Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), Murcia, Spain.

Abstract

This study examines the effect of shading and nitrogen nutrition on the accumulation of vitamins C and E in tomato. Treatments consisted of different N doses (3, 7 and 14 mM) combined with two different light intensities: non-shaded (control) and shaded plants covered with shade cloth (50% light). Decreasing the nitrogen dose from 14 to 7 mM did not affect total fruit yield regardless of the shading treatment. In addition, under 100% light treatment, N dose reduction increased vitamin C but decrease vitamin E concentrations. On the other hand, decreasing light intensity did not affect fruit yield but decreased vitamin C content and vitamin E in a lesser extend. Under high light conditions, in which shading is necessary for avoiding fruit damage, decreasing N dose is an environmental friendly practice that allows increasing fruit weight without affecting vitamin C.

Keywords: Bioactive compound; high temperature; ascorbic acid; tocopherol.

Resumen

En este trabajo se estudia el efecto del sombreado y la nutrición nitrogenada sobre la acumulación de vitaminas C y E en tomate. Los tratamientos consistieron en diferentes dosis de N (3, 7 and 14 mM) combinadas con dos intensidades de luz: 100% (plantas control) y plantas cubiertas con una malla de sombreado (50% luz). La reducción de la dosis de N de 14 a 7 mM no afectó al rendimiento, independientemente de la intensidad luminosa. Además, dicha reducción aumentó la concentración de vitamina C en fruto bajo condiciones de 100% luz, aunque disminuyó el contenido en vitamina E. Por otro lado, la disminución de la intensidad luminosa no afectó significativamente a la producción, aunque disminuyó el contenido de los frutos en vitamina C y, en menor medida, en vitamina E. Bajo condiciones de alta radiación, en las que la aplicación de sombreado es necesaria para evitar daños en el fruto, la disminución de la dosis de N, nos permite aumentar el peso medio de los frutos sin afectar al contenido en vitamina C, constituyendo además una práctica recomendable para minimizar la contaminación medioambiental.

Palabras clave: Compuestos bioactivos; alta temperatura; ácido ascórbico; tocoferol.

* E-mail: virginia.hernandez5@carm.es

1. INTRODUCCIÓN

El tomate además de su importancia económica, es considerado una fuente excelente de compuestos bioactivos y vitaminas [1]. Recientes investigaciones demuestran que la mayoría de estos metabolitos poseen capacidad antioxidante y protegen frente a los radicales libres causantes de los procesos de envejecimiento y de algunas otras enfermedades. La concentración de dichos compuestos en los frutos depende de factores genéticos, ambientales, agronómicos y post-cosecha [2]. Entre los factores ambientales que más afectan a la composición antioxidante y nutritiva de los frutos, se encuentran la luz y la temperatura [3]. La utilización de mallas de sombreo es una práctica agrícola que se utiliza con el fin de reducir la temperatura, especialmente durante los cultivos de verano en zonas cálidas. Esta práctica agrícola destinada a mejorar el rendimiento y evitar daños en el fruto, también puede afectar a la calidad y composición de los mismos. Por otro lado, el manejo de la nutrición mineral, en particular de nitrógeno, es uno de los factores agronómicos más influyentes en la composición final del fruto. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la utilización de mallas de sombreo y su interacción con la nutrición nitrogenada sobre el contenido de vitamina C y E de tomate.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Las plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Eufrates) se cultivaron bajo invernadero en macetas de 20 L, utilizando como sustrato una mezcla de fibra de coco y perlita (85:15). El riego se realizó mediante control automatizado con solución nutritiva Hoagland modificada para conseguir los diferentes tratamientos, que consistieron en tres niveles de nitrógeno (3, 7 y 14 mM N) en forma de nitrato, combinados con dos niveles de intensidad luminosa: control (100% luz) y sombreo (50% luz) mediante utilización de una malla de sombreo (AOL S 40). Los seis tratamientos resultantes se distribuyeron en un diseño de bloques al azar con dos bloques por tratamiento y cinco repeticiones por bloque. Los frutos se recolectaron durante los meses de junio y julio, una vez alcanzado el estado de madurez establecido (fruto rojo, sin defectos). El análisis de vitamina E (α -y γ -tocoferol) se realizó en un cromatografía líquida (HPLC) con un detector de fluorescencia ($E_{excitación} = 250$ nm, $E_{emisión} = 410$ nm). El contenido de vitamina C se determinó como la suma de ácido ascórbico y deshidroascórbico mediante HPLC con detector de diodos array ($\lambda = 210$ nm). Los resultados se analizaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA), con el programa estadístico SPSS 21.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los dos tratamientos de intensidad luminosa (100 y 50%), el rendimiento aumentó significativamente al incrementar la dosis de N de 3 a 7 mM, como consecuencia de un aumento en el número de frutos (Tabla 1). Sin embargo, no se observaron diferencias en el rendimiento al aumentar la dosis de 7 a 14 mM N. Respecto a los dos parámetros que determinan el rendimiento (número y peso de los frutos), por un lado, el aumento de la dosis de N aumentó significativamente el número de frutos, independientemente de la intensidad luminosa. Sin embargo, el efecto de la dosis de N sobre el peso medio del fruto, dependió de la intensidad luminosa. Mientras que en plantas control el aumento de la dosis de N de 7 a 14 mM no alteró el peso medio de los frutos, en las plantas bajo 50% luz, este aumento provocó una disminución significativa de este parámetro. La nutrición nitrogenada tiene un fuerte impacto en el desarrollo vegetativo y metabolismo de la planta y en consecuencia, en la transporte de carbono hacia los frutos [4]. De acuerdo con Dumas *et al.* [2], existe una interacción entre efecto del N y la luz sobre la producción, de forma que un aumento del aporte de N en condiciones de baja radiación produce una disminución de la producción, debido al menor peso que adquieren los frutos. Así, la disminución del peso de los frutos bajo tratamiento 50% luz y 14 mM N es atribuible a una disminución del transporte de

fotoasimilados al fruto debido a i) la reducción de la intensidad luminosa y ii) un efecto de “dilución” de dichos asimilados resultado del aumento del número de frutos como consecuencia del aumento de la dosis de N. La concentración de vitamina C disminuyó significativamente con el aumento de la concentración de N en el medio de cultivo y con el sombreado (Tabla 2, Figura 1A). Según Bernard et al. [3], el contenido de ácido ascórbico en tomate tiende a aumentar en frutos cultivados con la menor dosis de N debido a la disminución de la producción, que se traduce en la concentración de dichos compuestos en fruto. Respecto a la luz, existen evidencias de que la luz puede aumentar el contenido de compuestos antioxidantes como la vitamina C, probablemente debido al papel fotoprotector de dicho compuesto [2,5]. Respecto al contenido de vitamina E, el sombreado disminuyó su concentración en fruto, aunque en menor medida que la lo observado para vitamina C, no observándose diferencias entre plantas bajo 50 y 100% luz en el tratamiento 3 mM N (Tabla 2, Figura 1B). De acuerdo con estos resultados, en otros cultivos como lechuga se ha descrito una disminución de la concentración de la vitamina E como consecuencia de la aplicación de sombreado [5]. Otros estudios realizados en tomate muestran el papel fotoprotector de la vitamina E sobre el sistema fotosintético de la planta ante situaciones de altas temperaturas y alta radiación, incrementando su concentración, tal y como se observa en nuestro estudio, en plantas bajo tratamiento con 100% luz [6]. Por otro lado, el aumento de la dosis de N aumentó significativamente la concentración de esta vitamina, independientemente de la intensidad de luz.

4. CONCLUSIONES

La reducción de la dosis de N de 14 a 7 mM no afectó al rendimiento, independientemente de la intensidad luminosa. Dicha reducción aumentó la concentración de vitamina C bajo condiciones de 100% luz, pero disminuyó el contenido en vitamina E. Por otro lado, la disminución de la intensidad luminosa no afectó significativamente a la producción, aunque disminuyó el contenido de los frutos en vitamina C y, en menor medida, en vitamina E. Bajo condiciones de sombreado, necesarias para evitar daños en el fruto en caso de alta radiación, la disminución de la dosis de N es una práctica recomendable que permite aumentar el peso de los frutos sin afectar al contenido en vitamina C, constituyendo además una práctica recomendable para minimizar la contaminación medioambiental.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a María Virtudes Molina, Inma Garrido y Juana Cava por su ayuda con los análisis, y a FEDER, por la financiación de este estudio asociado al proyecto (PO07-042).

6. REFERENCIAS

- [1] Erge, H., Karadeniz, F. (2001). Bioactive compounds and antioxidant activity of tomato cultivars. *Int. J. Food. Sci. Nutr.* 14, 968-977.
- [2] Dumas, Y., Dadomo, M., Lucca, G. (2003). Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. *J. Sci. Food. Agric.* 83, 369-382.
- [3] Bernard, C., Gautier, H., Grasselly, D., Navez, D., Caris, D., Genard, M. (2009). Effects of low nitrogen supply on tomato fruit yield and quality with special emphasis on sugars, acids, ascorbate, carotenoids, and phenolic compounds. *J. Agric. Food. Chem.* 57, 4112-4123.
- [4] Warner, J., Zhang, T., Hao, X. (2004). Effects of nitrogen fertilization on fruit yields and quality of processing tomatoes. *J. Plant. Nutr. Soil. Sci.* 84, 865-871.
- [5] Yan-Hong, Z., Ying-Yun, Z., Xin, Z., Hai-Jin, Y., Kai, S., Jing-Quan, Y. (2009). Impact of light variation on development of photoprotection antioxidants, and nutritional value in (*Lactuca sativa L.*). *J. Agric. Food Chem.* 57, 5494-5500.

[6] Spicher, L., Glauser, G., Kessler, F. (2016). Lipid antioxidant and galactolipid remodeling under temperature stress in tomato plants. *Front. Plant Sci.* 7, 1-12.

Tabla 1. Producción (kg/planta), nº de frutos y peso medio (g) de tomate cultivado con diferentes intensidades de luz (100 % y 60 %) y diferentes dosis de N (3, 7 y 14 mM NO₃).

		Producción	Nº frutos	Peso medio
Luz (%)	50	2,27	30,6	74,7
	100	2,29	27,7	86,9
		n.s.	n.s	**
Nitrógeno (mM)	3	1,68 ^a	20,1 ^a	84,7 ^b
	7	2,48 ^b	30,1 ^b	84,4 ^b
	14	2,67 ^b	36,5 ^c	73,1 ^a
		***	***	**
Interacción				
Luz	Nitrógeno			
100	3	1,50 ^a	19,2	77,9 ^{ab}
	7	2,33 ^{bc}	33,6	70,0 ^a
	14	2,96 ^c	39,0	76,2 ^{ab}
50	3	1,87 ^{ab}	21,0	91,7 ^{bc}
	7	2,62 ^c	26,6	98,9 ^c
	14	2,38 ^{bc}	34,0	70,1 ^a
		**	ns	***

Tabla 2. Significancia de los efectos principales (% luz y dosis N) sobre vitaminas C y E.

	Vitamina C	Vitamina E
% Luz (L)	***	n.s
Nitrógeno (N)	**	**
Interacción	n.s	n.s

, *, Indican diferencias significativas entre medias con un nivel de probabilidad del 0.1, 1 y 5%, respectivamente. n.s., no significativo

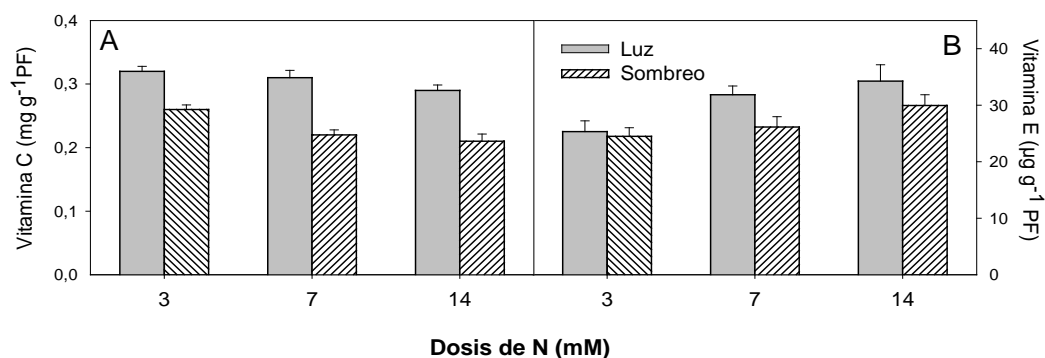


Figura 1. Concentración de vitamina C (A) y vitamina E (B) en frutos de tomate cultivados bajo los diferentes tratamientos de luz y N. Los valores son medias ± SE (n = 10).

Evaluation of bacterial growth in a thermally treated smoothie

Evaluación del crecimiento bacteriano en un smoothie térmicamente tratado

G.A. González-Tejedor*, F. Artés-Hernández^{1,2}, P.S. Fernández^{1,2}

¹Departamento de Ingeniería de Alimentos. Universidad de Politécnica de Cartagena - UPCT. 30203. Cartagena, Spain.

²Instituto de Biotecnología Vegetal - IBV. UPCT. Campus Muralla del Mar s/n. 30202. Cartagena, Spain.

Abstract

The growth of *Listeria monocytogenes* in a purple smoothie made of fresh fruit and vegetables during storage at 5 and 28°C has been evaluated. After smoothie elaboration, it was thermally treated during 3 min at 95 °C and subsequently inoculated. A very dynamic behavior of listeria at 28°C was found, reaching the death stage after 10 days in all concentrations assayed. There was no death nor growth of *listeria* at 5°C.

Keywords: beverage; minimal processing; shelf life; heat treatment; food safety.

Resumen

En este trabajo se ha evaluado el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en un smoothie morado a base de fruta y hortalizas frescas durante una simulación de la vida comercial a 5 °C y 28°C. Tras la preparación del smoothie, éste se procesó térmicamente a 95 °C durante 3 min y posteriormente fue inoculado. Se observó un comportamiento muy dinámico de la *listeria* durante la conservación a 28°C, alcanzando la fase de muerte tras 10 días para todas las concentraciones ensayadas. No se registró muerte ni crecimiento de la *listeria* a 5°C.

Palabras clave: batido; procesado mínimo; vida útil; tratamiento térmico; seguridad alimentaria.

1. INTRODUCCIÓN

Diferentes factores y el contacto humano durante las prácticas de cosecha y la manipulación posterior pueden causar contaminación microbiana de productos frescos [1]. La disponibilidad de azúcar, nutrientes y la alta actividad de agua de las frutas y hortalizas, promueven el rápido crecimiento de patógenos alimentarios [2]. La posible presencia de especies patógenas en las materias primas (frutas y hortalizas) principalmente respecto a *Listeria monocytogenes*, representa un riesgo microbiológico incluso a temperaturas de refrigeración [3]. Por lo tanto, para garantizar su seguridad, el smoothie de frutas y hortalizas requiere un proceso de pasteurización adecuado (86-96°C durante 2 minutos) para posibilitar la destrucción de patógenos y reducir la flora microbiana de deterioro. Sin embargo, el proceso térmico puede ser acortado a 15–30 s.

* E-mail: gerardo.gonzalez@utp.ac.pa

mediante una pasteurización rápida a elevada temperatura por lo que el estudio del binomio tiempo temperatura es fundamental [4]. También es necesario evitar la recontaminación posterior del producto con microorganismos patógenos.

Se ha demostrado la presencia de *L. monocytogenes* bajo condiciones de refrigeración en frutas y hortalizas, como tomates, naranjas, fresas y ensalada de frutas frescas [5]. El pH mínimo para el crecimiento de *L. monocytogenes* fue reportado en 4.3 utilizando un medio acidificado con HCl [6]; por otra parte, el pH mínimo que permite el crecimiento de este patógeno en los productos alimenticios es de 4.6 [7]. En alimentos listos para comer a base de frutas ácidas puede representar un peligro potencial para la salud dada la conocida capacidad de *L. monocytogenes* para sobrevivir en productos almacenados durante largos periodos en refrigeración. En este sentido, algunos autores han encontrado que *L. monocytogenes* debe utilizarse como el organismo de referencia en la evaluación de letalidad de procesos UV y térmicos para zumo de manzana (pH = 3.68), ya que este patógeno mostró mayor resistencia que *E. coli*, *Salmonella enteritidis* o *Salmonella typhimurium* a este pH bajo [8].

En alimentos listos para el consumo que puedan permitir el desarrollo de *L. monocytogenes* antes de que el alimento haya dejado el control inmediato de la empresa alimentaria que los haya producido, debe demostrar que el producto no superará el límite de 100 UFC/g durante su vida útil; Si no se puede demostrar, se considera satisfactorio si todos los valores observados indican ausencia de la bacteria e insatisfactorio si se detecta la presencia de la bacteria en cualquiera de las muestras [9].

El objetivo de este estudio fue evaluar la viabilidad o crecimiento de *L. monocytogenes*, durante la conservación a 5 y 28°C en smoothies morados a base de fruta y hortalizas frescas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Preparación de la Cepa utilizada

La cepa de *L. monocytogenes* CECT 4032 fue suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo. Aproximadamente 100 µL de la cepa se inocularon en 50 mL de TSB (Tryptic Soy Broth) y se incubó a 37°C durante 24 horas para obtener las células en fase de crecimiento estacionario con una concentración aproximada de 1×10^9 UFC/mL.

2.2 Inoculación de la muestra de smoothie

Las muestras de smoothie (20 mL) previamente preparadas, desinfectadas con Hipoclorito de Sodio de uso alimentario (150 ppm; 2 min), enjuagadas en agua de la red 1 min y tratadas térmicamente a 95°C se inocularon con *L. monocytogenes* (CECT 4032) en concentraciones iniciales de 10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5 . Se almacenaron inmediatamente a 5 y 28°C hasta su uso para los estudios microbiológicos en condiciones de oscuridad. Se estudió el crecimiento de *L. monocytogenes* (CECT 4032) durante su almacenamiento a las temperaturas indicadas.

2.3 Recuento microbiológico de *L. monocytogenes*

El medio utilizado para células viables fue Tryptona Soya Agar (TSA). Las diluciones seleccionadas se incubaron a 37°C durante 24 horas, posteriormente se realizó el conteo. El crecimiento y/o reducción de células viables se expresó como el logaritmo de UFC/mL partiendo del día 0.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinó el crecimiento de *Listeria monocytogenes* inoculada en smoothies tratados térmicamente a 95 °C utilizando concentraciones de 10^2 a 10^5 a durante una vida comercial de 5 y 28°C.

3.1 Smoothies conservados a 5°C

En la Fig. 1, se observa que no existe crecimiento de *L. monocytogenes* en smoothies inoculados y conservados a 5°C, sino que con el tiempo esta población tiende a disminuir lentamente ya que tras 35 días de almacenamiento la concentración bajó aproximadamente media unidad logarítmica para las diferentes concentraciones de inoculación ensayadas. En la muestra sin inocular no se produjo crecimiento bacteriano apreciable.

3.2 Smoothies conservados a 28°C

En los smoothies conservados a 28°C (Figura 2), *L. monocytogenes* tuvo un comportamiento muy diferente en comparación con los conservados a 5 °C. Ello se debió a que esta temperatura de conservación se acerca mucho a la temperatura óptima de crecimiento de este microorganismo. Así, tras crecer hasta niveles de 7 log₁₀ UFC/mL en todas las concentraciones iniciales ensayadas, la fase de declive fue muy pronunciada y después de 15 días de almacenamiento, dicha población disminuyó a niveles inferiores a 10³ UFC/mL. En la muestra sin inocular no se produce un crecimiento bacteriano apreciable.

L. monocytogenes ha mostrado que, a valores cercanos de pH a 4.5, no pudo crecer a una temperatura de conservación de 5 °C. No obstante, el microorganismo fue capaz de proliferar a concentraciones elevadas en el smoothie a una temperatura cercana a la óptima de crecimiento (28 °C). Ello indica que la temperatura es una barrera determinante para el control de su proliferación en el smoothie estudiado. Se ha demostrado que la presencia de *L. monocytogenes* bajo condiciones de refrigeración en frutas y hortalizas [5]. Nuestros resultados indican que, para evitar el riesgo que supone la presencia de recuentos elevados de *L. monocytogenes* en este tipo de productos, es necesario evitar la recontaminación del producto final por este microorganismo y garantizar una adecuada refrigeración. Este factor actúa como una importante medida de control adicional.

4. CONCLUSIONES

El comportamiento de *L. monocytogenes* inoculada en el smoothie, se mostró dependiente de la temperatura y concentración. Así, se apreció estable sin observarse crecimiento en la población durante 35 días a 5°C, apreciándose una cierta inactivación durante el almacenamiento. A 28°C, temperatura muy cercana a la óptima para el crecimiento de este microorganismo, se vio que *L. monocytogenes* fue capaz de crecer, pese a que el pH del producto era cercano al inhibitorio descrito en la bibliografía sin que existiesen potentes agentes antimicrobianos que controlasen su crecimiento. Es necesario llevar a cabo estudios adicionales para caracterizar los mecanismos de este comportamiento y su posible interés en el establecimiento de procesos combinados.

5. AGRADECIMIENTOS

Se agradece la financiación al Ministerio de Economía y Competitividad MINECO (Proyectos AGL2013-48830-C2-1-R y AGL2013-48993-C2-1-R) y a los fondos FEDER. G. González agradece al gobierno de Panamá la beca para realizar el doctorado en la UPCT.

6. REFERENCIAS

- [1] De Roever, C. (1998). Microbial safety evaluation and recommendation on fresh produce. Food Control 9, 321-347
- [2] Tournas, V. H., Heeres, J., Burgess, L. (2006). Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. Food Microbiol. 23, 684-688.
- [3] Scolari, G., Zacconi, C., Busconi, M., Lambri, M. (2015). Effect of the combined treatments of high hydrostatic pressure and temperature on *Zygosaccharomyces bailii* and *Listeria monocytogenes* in smoothies. Food Control 47, 166-174.

- [4] Castillojo, N., Martínez-Hernández, G.B., Gómez, P.A., Artés F., Artés-Hernández, F. (2016). Red fresh vegetables smoothies with extended shelf life as an innovative source of health-promoting compounds. J Food Sci Technol. In press. DOI: 10.1007/s13197-015-2143-2.
- [5] Cobo-Molinos, A., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Valdivia, E., & Gálvez, A. (2008). Inactivation of *Listeria monocytogenes* in raw fruits by enterocin AS-48. J Food Protec. 71(12), 2460–2467.
- [6] Tienungoon, S., Ratkowsky, D.A., McMeekin, T.A. Ross T. (2000) Growth Limits of *Listeria monocytogenes* as a Function of Temperature, pH, NaCl, and Lactic Acid. Appl Environ Microbiol. 66(11): 4979–4987
- [7] Carpentier, B., Cerf, O. (2011). Review — Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. Int. J. Food Microbiol. 145, 1–8.
- [8] Benlloch-Tinoco, M., Pina-Pérez, M.C, Martínez-Navarrete, N., Rodrigo, D. (2014). *Listeria monocytogenes* inactivation kinetics under microwave and conventional thermal processing in a kiwifruit puree. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 22, 131–136.
- [9] Regulation (EC) 1441/2007. (2007). Commission regulation on microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of the European Union 32, 12–29.

Figuras

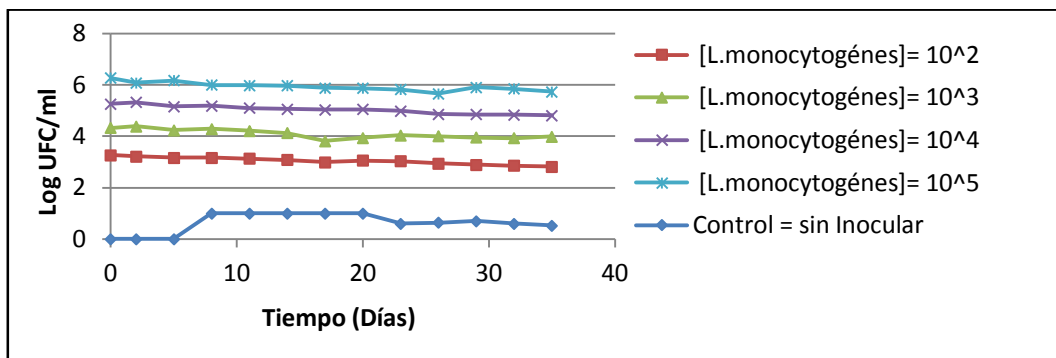


Figura 1. Gráfico de crecimiento de *Listeria monocytogenes* inoculada en smoothies y conservados a 5°C.

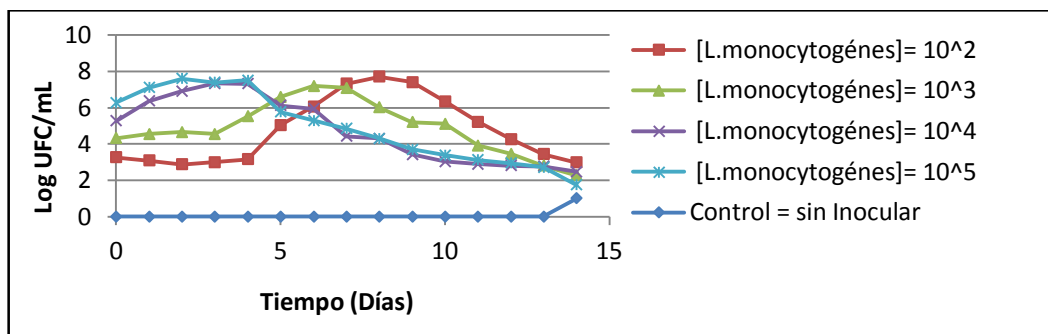


Figura 2. Gráfico de crecimiento de *Listeria monocytogenes* inoculada en smoothies y conservados a 28°C.

Self cooling bag-in-box package and method of manufacturing the same

Envase bag in box autoenfriante y método de fabricación del mismo

E. Hernández*, A. López, A. Esnoz

Ingeniería del Frío y la Seguridad Alimentaria (IFSA), Departamento de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola. Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203. Cartagena, Murcia, Spain.

Abstract

This patent refers to a self-cooling bag in box package, that is made up of: (1) a flexible package (bag), that contains a liquid food or a drink, or another liquid product; (2) a cooling jacket or evaporator, constructed with a flexible wall and that surrounds to the cited flexible package; (3) an adsorber contained in a box with flexible walls, separated and independent of the previous one; and (4) a rigid package (box), that contains the previous set, formed by the bag with the liquid product, the coolant jacket, and the adsorber. This rigid package or box will be able to have a cylindrical shape, of barrel, or a shape of parallelogram, or any other shape. The mentioned coolant jacket and the adsorber are separated by means of a valve or a thermal sealed film to the mouth of the evaporator, so that when is opened this valve or breaks this seal begins the process of cooling of the liquid food, since within the mentioned jacket, the evaporation at vacuum takes place, of a coolant, like the water, being adsorbed the steam of this coolant in the contained adsorbent material in the adsorber, that also stays at vacuum.

Keywords: Refrigeration; vacuum; adsorber; evaporator.

Resumen

Esta patente se refiere a un envase bag-in-box autoenfriante, compuesto por: (1) un envase flexible (bag), que contiene un alimento líquido o una bebida, u otro producto líquido; (2) una camisa de enfriamiento o evaporador, construida con una pared flexible y que rodea al envase anterior; (3) un adsorbedor contenido en una caja con paredes flexibles, separada e independiente de la anterior; y (4) un envase rígido (box), que contiene el conjunto anterior, formado por la bolsa con el producto líquido, la camisa de refrigeración, y el adsorbedor. Este envase rígido o box podrá tener una forma cilíndrica, de barril, o de caja en forma de paralelepípedo, o cualquier otra forma. La citada camisa de refrigeración y el adsorbedor está separada por medio de una válvula o una película unida o termosellada a la boca del evaporador, de modo que cuando se abre esta válvula o se rompe este sello comienza el proceso de enfriamiento del alimento líquido, ya que en la citada camisa tiene lugar la evaporación a vacío de un refrigerante, preferentemente agua, siendo adsorbidos los vapores de este refrigerante en el material adsorbente contenido en el adsorbedor, que se mantiene también a vacío.

Palabras clave: Refrigeración; vacío; adsorbedor; evaporador.

* E-mail: dptotecnico@mhrefrigeracion.es

1. INTRODUCCIÓN

A partir de 1987 comienzan a patentarse diversos envases autoenfriantes, que permiten el enfriamiento de la bebida envasada en poco tiempo y sin necesidad de un agente exterior al propio envase, pero no existe ninguna patente que se refiera a un sistema de envasado *bag in box* autoenfriante, con la solución técnica que se detalla en esta patente.

Existe un grupo de patentes donde el principio utilizado para producir el enfriamiento de la bebida es la evaporación de un líquido a vacío [1] (preferentemente agua), en presencia de un adsorbedor [2] (carbón activado, zeolita, nitrato de amonio, polímeros adsorbedores y sulfato de calcio anhidro). Dentro de este grupo están las patentes EP1054222, o la US Application 2005/0034474 A1, de título "*Container with at least one vacuum chamber with an access opening, especially a beverage container, such as a beer barrel or the like*", o la patente EP1426326, que se refieren a un barril reutilizable de cerveza, que contiene un dispositivo que realiza el autoenfriamiento de la cerveza o de la bebida envasada, pero no se refiere a un envase flexible contenido en un envase rígido como es el caso del sistema de envasado *bag in box* (bolsa flexible en caja más o menos rígida).

También, se tiene un segundo grupo de patentes, donde, como método de enfriamiento, se utiliza la reacción endotérmica, que se produce en una cámara alojada en el interior de la cámara que contiene la bebida. Algunos ejemplos de estas patentes son la Patente CA2496377, o la Patente WO02085748.

Por último, un tercer grupo de patentes, utiliza como método de refrigeración la evaporación de un gas licuado (hidrofluorocarbonados, clorofluorocarbonados, CO₂, mezclas de hidrocarburos y gases halógenos, Freón 22 y mezcla de aire/CO₂) que se almacena a gran presión en un envase alojado en las inmediaciones de la bebida que se quiere enfriar. Ejemplos de estas patentes son las patentes americanas US Patent US2005/039317, y la US Patent 2005/066682, que tiene por título *Cryogenic self-cooling beverage container and process of manufacturing the same*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta patente se refiere a un envase *bag in box* autoenfriante, que está compuesto por: (1) un envase flexible (denominado *bag* en inglés por ser una bolsa), que contiene un alimento líquido o una bebida, u otro producto líquido; (2) una camisa de enfriamiento o evaporador, construida con una pared flexible y que rodea al envase anterior; (3) un adsorbedor contenido en una caja con paredes flexibles, separada e independiente de la anterior; y (4) un envase rígido, denominado *box* en inglés, que contiene el conjunto anterior, formado por la bolsa con el producto líquido, la camisa de refrigeración, y el adsorbedor citados anteriormente (Figura 1). Este envase rígido o *box* podrá tener una forma cilíndrica, de barril, o de caja en forma de paralelepípedo, o cualquier otra forma. La citada camisa de refrigeración y el adsorbedor están separados por medio de una válvula o una película o film unido o termosellado a la boca del evaporador, de modo que cuando se abre la válvula o se rompe este film o sello comienza el proceso de enfriamiento del alimento líquido o la bebida envasada, ya que en la citada camisa tiene lugar la evaporación a vacío de un refrigerante, preferentemente agua, siendo adsorbidos los vapores de este refrigerante en el material adsorbente contenido en el adsorbedor, que se mantiene también a vacío [3]. Este sistema de envasado sería de aplicación para alimentos líquidos, bebidas carbonatadas y no carbonatadas, bebidas alcohólicas o refrescos, u otros productos líquidos.

2.1 Materiales utilizados

Los materiales utilizados en las bolsas son, por ejemplo: (1) films de polietileno: LLDPE, MLDPE, HDPE; y/o (2) films Nylon/LLDPE: laminado, co-extrusionado; y (3) films barrera: laminados plásticos metalizados, EVOH, o láminas metálicas.

El envasado BIB es muy respetuoso con el medioambiente, ya que puede ser reciclado, y reduce el volumen de los residuos de los envases. Utiliza un 60% menos de materias primas plásticas, que otros envases como las botellas de Polietileno, por ejemplo, por lo que contribuye a la reducción del consumo de las materias primas correspondientes. Si se utiliza cartón en la caja (o *box*), puede constituir hasta el 85% del peso del envase BIB, y puede ser totalmente reciclado. La bolsa vacía consume una tercera parte de las materias primas plásticas necesarias para un envase convencional de volumen similar, y cuando se desecha ocupa el 5% del volumen de cualquier otro envase plástico rígido del mismo volumen.

2.2 Aplicaciones industriales

Este envase *bag in box* autoenfriante, objeto de esta invención, podrá ser aplicado al envasado de bebidas alcohólicas, como vinos, sidras y cervezas, y no alcohólicas, como refrescos, zumos, productos lácteos, sean carbonatadas o no carbonatadas, y al envasado de otros líquidos, alimenticios o no, cuya temperatura se quiera acondicionar antes de su consumo, uso o aplicación, por medios propios del envase sin el concurso de agentes externos al mismo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los métodos y diseños que se presentan en las distintas patentes analizadas en el apartado de introducción aparecen una gran cantidad de inconvenientes, que se resumen a continuación:

- En la mayoría de las patentes propuestas, se tiene un exceso de volumen y peso del envase y del sistema de autoenfriamiento, en relación con el volumen de bebida envasada.
- En el caso de las patentes del segundo grupo, se utilizan productos químicos o reactivos que no deben entrar en contacto con alimentos, como es la bebida envasada.
- En el caso de las patentes del tercer grupo, se utilizan fluidos refrigerantes que no deben evacuarse a la atmósfera, o desecharse con el envase, una vez utilizado. Se usan también, presiones excesivas en cámaras dentro de los envases.
- En la mayoría de los casos, se utilizan dispositivos de enfriamiento que son demasiado caros por su complejidad, como para ser aplicados a un envase de relativamente pequeña capacidad.

Por todo lo anterior, la invención objeto de esta patente trata de resolver parte de los inconvenientes apuntados anteriormente, descartando los métodos de autoenfriamiento de los grupos de patentes segundo y tercero, mencionados anteriormente, por su peligrosidad, y utilizando un sistema de envasado que disminuye considerablemente el peso del mismo y del dispositivo de enfriamiento en relación a la cantidad de bebida envasada.

4. CONCLUSIONES

Esta patente implica innovaciones en el ámbito de la tecnología del envasado de alimentos líquidos, particulados o no, bebidas y productos líquidos en general, ya que permite el auto-acondicionado de la temperatura del líquido envasado en *bag-in-box*, provocando su autoenfriamiento, momentos antes de su consumo o de su aplicación, sin necesidad de la participación de ningún agente externo de enfriamiento.

También, esta patente está relacionada con el ámbito de la tecnología de producción de frío por adsorción, ya que implica una innovación en los materiales de construcción de las paredes del evaporador y del adsorbedor, ya que se propone la utilización de materiales flexibles, a pesar de trabajar a vacío, tanto en el evaporador como en el adsorbedor. Con esta propuesta se aligera de forma apreciable el peso del sistema de enfriamiento por adsorción, tanto del evaporador como del adsorbedor.

5. AGRADECIMIENTOS

A la empresa Damm S.A. por su financiación y colaboración en la realización de estos trabajos.

6. REFERENCIAS

[1] Keller, M. (2005). Container with at least one vacuum chamber with an access opening, especially a beverages container, such as a beer, barrel or the like. N^o Patente CA2477410.

[2] Charles, P.C., Dunwoody P.R., Arnell, S.R., Paul, R.C., Spottiswoode, M.S. (2005). Self-cooling can. N^o de Patente US6889507.

[3] Lu, Y.Z. (2002). Adsorption air-conditioning system with zeolite-water working pair powered by waste heat of fuel gas exhausted from Diesel locomotive. PhD dissertation. Shanghai Jiaotong University.

Figuras

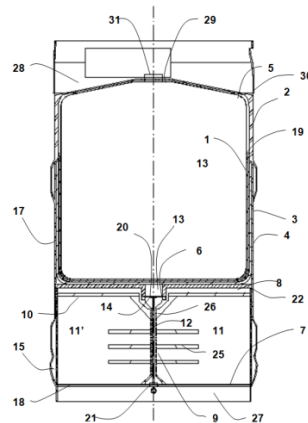


Figura 1. Sección bag-in-box autoenfriante.

The false root-knot nematode *Nacobbus aberrans* modifies the level of phenylpropanoid compounds during infection of chilli pepper

El nemátodo falso agallador *Nacobbus aberrans* modifica los niveles de compuestos fenilpropanoides durante la infección de chile

N. López-Martínez* ^{1,2}, J.P. Fernández-Trujillo ², M. Biesaga ³, E. Zavaleta-Mejía ⁴

¹ Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo km. 38.5 Carr. México-Texcoco, Chapingo, Estado de México CP 56230, México.

² Departamento de Ingeniería de Alimentos y Equipamiento Agrícola. Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). Campus Paseo Alfonso XIII, 48. ETSIA. 30203. Cartagena (Murcia), Spain.

³ Department of Chemistry, University of Warsaw, Pasteura 1, 02-093. Warsaw, Poland.

⁴ Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Km. 36.5, Carr. México-Texcoco. Montecillo, Edo. De México, C.P. 56230, México.

Abstract

In this work, some phenylpropanoid metabolites in CM334 chilli pepper plants infected by the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans* were determined. Roots were chemically analyzed for their lignin content and phenylpropanoid profile by quantitative lignin assay and HPLC-ESI/MS. The *in vitro* effect of flavonoids on second-stage juveniles (J₂) of *N. aberrans* and *Meloidogyne incognita* was also tested. The lignin content was similar in all treatments excepting when *M. incognita* was involved ($P<0.05$). Phenolic acids (Hidroxibenzoic -pHBA-, gallic, caffeic, syringic, ferulic, vanillic and chlorogenic) and the flavonoid quercetin-3-O-rutinoside were found in the root system. Concentration of pHBA, ferulic and chlorogenic acids was lower in inoculated plants than in the control ($P<0.05$) at any sampling date. Quercetin-3-O-rutinoside had a nematocidal effect on J₂ of *N. aberrans*, whereas it only had a nemastatic effect on *M. incognita*. These results indicate that *N. aberrans* modifies the level of phenylpropanoid compounds during the infection of chilli pepper.

Keywords: Flavonoids; lignin; liquid chromatography-mass spectrometry; phenolic acids.

Resumen

En este trabajo, algunos metabolitos fenilpropanoide en plantas de chile CM334 infectadas por el nemátodo falso agallador *Nacobbus aberrans* fueron determinados. Las raíces fueron químicamente analizadas para su contenido de lignina y perfil de fenilpropanoides mediante un ensayo cuantitativo de lignina y HPLC-ESI/MS. El efecto *in vitro* de flavonoides

* E-mail: noessp@yahoo.com

en larvas juveniles (J₂) de *N. aberrans* y *Meloidogyne incognita* también fue probado. El contenido de lignina fue similar en todos los tratamientos, excepto cuando *M. incognita* estuvo involucrado ($P<0.05$). Ácidos fenólicos (hidroxibenzoico -pHBA-, gálico, caféico, siríngico, ferúlico, vanílico y clorogénico) y el flavonoid quercetin-3-rutinósido fueron encontrados en el sistema radical. La concentración de los ácidos pHBA, ferúlico y clorogénico fue menor en las plantas inoculadas en comparación con el control ($P<0.05$) en cualquier tiempo de muestreo. El compuesto quercetin-3-rutinósido tuvo un efecto nematocida en larvas de *N. aberrans*, mientras que éste solamente tuvo un efecto nematostático en *M. incognita*. Estos resultados indican que *N. aberrans* modifica el nivel de compuestos fenilpropanoides durante la infección de chile.

Palabras clave: Flavonoides; lignina; cromatografía de líquidos-espectrometría de masas; ácidos fenólicos.

1. INTRODUCTION

The resistance of the genotype of chilli pepper CM334 against nematodes is associated with the phenylpropanoid pathways [1]. Although there are several reports about the implication of phenylpropanoids in plant-nematode interaction, these results are focused on a few nematode species and little information about the “false root-knot nematode” *Nacobbus aberrans* has been published. Due to its economic importance and the complex parasitic habit, *N. aberrans* is considered as one of the top ten nematodes in a recent survey and review [2]. With the aim of elucidate some changes in the level of phenylpropanoid compounds during infection of CM334 chilli pepper plants by *N. aberrans*, we assessed the lignin content and the profiling and characterization of soluble phenolic acids and flavonoids. On the other hand, the toxic effect of flavonoids identified in the root system was also tested.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Chilli pepper plants, inoculum preparation and inoculation

The maintaining of plants (CM334), inoculum preparation and inoculation were carried out according a previous report [1]. Roots were collected at 7, 14, 21 and 28 days after nematode inoculation for their analysis of phenylpropanoid compounds. For *in vitro* test and lignin determination, *Meloidogyne incognita* was also included.

2.2 Analysis of phenylpropanoids compounds

The lignin content was determined by derivatization with thioglycolic acid [3]. The profiling, characterization and quantity of soluble phenolic acids and flavonoids in root system was carried out using a HPLC-ESI-MS method [4]. The toxic effect of flavonoids, found in root system, on J₂ of *N. aberrans* and *M. incognita* were tested *in vitro* [1]. Two independent experiments were conducted.

2.3 Statistical Analysis

Mean values (n = 6) were subjected to ANOVA and the Tukey test was applied at $P<0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Lignin content in roots of chilli pepper plants

Generally, in each sampling time not differences in the lignin content between treatments were detected ($P<0.05$), excepting when *M. incognita* was involved (Table 1). The cell wall

lignification after infection is associated with the tolerance of plants to nematode infection as a general response to pathogenic infection to protect the adjacent cells from nematode invasion [5].

3.2 Phenylpropanoid compounds during infection of chilli pepper by *N. aberrans*

In the profile of root extracts, hidroxibenzoic (*p*-HBA), gallic, caffeic, syringic, ferulic, vanillic and chlorogenic acids were found (Table 2). On the other hand, the compound quercetin-3-O-rutinoside (rutin) was the only flavonoid found in the root system. In some sampling points, inoculated plants had lower contents of both phenolic acids and quercetin-3-O-rutinoside than control plants ($P < 0.05$). Flavonoids are produced as part of the defense response to nematode infection rather than being an integral component of the mechanisms used by nematodes to induce feeding sites [6].

3.3 Nematicidal activity of flavonoid

The flavonoid rutin had a nematocidal effect on J₂ of *N. aberrans*, whereas on *M. incognita* the effect was only nemastatic (Table 3). A previous report indicate that certain flavonoids act as repellents for specific species of nematodes and inhibit both their motility and hatching at millimolar concentrations [7].

4. CONCLUSIONS

The false root-knot nematode *Nacobbus aberrans* was able to modify the levels of phenylpropanoid compounds during the infection in chilli pepper. This modification induced by the nematode in the profile of soluble phenolic acids was only differed quantitative but not qualitatively. On the other hand, the flavonoid rutin has a differential particular toxic effect in each the nematodes used in this work.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

Our thanks go to Dirección General Académica of Universidad Autónoma Chapingo for the financial support for participate in WiA2016. Thanks are due to CONACYT for financial support of the Research Project 46331-Z.

6. REFERENCES

- [1] López-Martínez, N., Colinas-León, M.T., Peña-Valdivia, C.B., Salinas-Moreno, Y., Fuentes-Montiel, P., Biesaga, M., Zavaleta-Mejía, E. (2011). Alterations in peroxidase activity and phenylpropanoid metabolism induced by *Nacobbus aberrans* Thorne and Allen, 1944 in chilli (*Capsicum annuum* L.) CM334 resistant to *Phytophthora capsici* Leo. Plant Soil 338, 399-409.
- [2] Jones, J.T., Haegeman, A., Danchin, E. G., Gaur, H.S., Helder, J., Jones, M. G., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, J.E., Wesemael, W. M., Perry R.N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. Mol. Plant Pathol. 14(9), 946-961.
- [3] Lange, B.M., Lapierre, C., Sandermann, H. (1995). Elicitor-induced spruce stress lignin. Plant Physiol. 108, 1277-1287.
- [4] Sergiel, I., Pohl, P., Biesaga, M. (2014). Characterization of honeys according to their content of phenolic compounds using high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Food Chem. 145, 404-408.
- [5] Dhakshinamoorthy, S., Mariama, K., Elsen, A. De Waele, D. (2014) Phenols and lignin are involved in the defence response of banana (*Musa*) plants to *Radopholus similis* infection. Nematology 16, 565-576.
- [6] Jones, J. T., Furlanetto, C., Phillips, M. S. (2007). The role of flavonoids produced in response to cyst nematode infection of *Arabidopsis thaliana*. Nematology 9(5), 671-677.
- [7] Wuyts, N., Swennen, R., De Waele, D. (2006). Effects of plants phenylpropanoid products and selected terpenoids and alkalids on the behaviour of the plant-parasitic nematodes *Radopholus similis*, *Pratylenchus penetrans* and *Meloidogyne incognita*. Nematology 8, 89-101.

Tables

Table 1. Lignin content (μg lignin per mg cell wall dry weight) in roots of chilli pepper plants (*Capsicum annuum*) CM334 inoculated with the nematode *Nacobbus aberrans* or *Meloidogyne incognita*.

Treatment	Time after inoculation (days)			
	7	14	21	28
Non-infected	21 ^a	22.6 ^a	23.2 ^a	29.4 ^a
Infected with <i>N. aberrans</i>	23 ^a	23.4 ^a	24.3 ^a	30.2 ^a
Infected with <i>M. incognita</i>	22 ^a	27.1 ^a	27.8 ^a	28.5 ^a

Value are mean (n=6). Data in the same column followed by the same letter are not different ($P<0.05$).

Table 2. Phenolic acids and flavonoids ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of dry matter) in roots of chilli pepper plants (*Capsicum annuum*) CM334 inoculated with the nematode *Nacobbus aberrans*.

Compound	Time after inoculation (days)							
	7		14		21		28	
	Inoculated	Control	Inoculated	Control	Inoculated	Control	Inoculated	Control
<i>p</i> -HBA	1.5 ^b	4.2 ^a	1.4 ^b	2.4 ^a	1.2 ^b	1.6 ^a	0.8 ^b	1.3 ^a
Gallic	2.5 ^b	4.7 ^a	0.9 ^b	1.2 ^a	1.1 ^a	1.12 ^a	1.04 ^a	1.02 ^a
Caffeic	3.2 ^b	6.1 ^a	1.2 ^a	1.3 ^a	1.6 ^a	1.5 ^a	1.3 ^a	1.4 ^a
Syringic	1.8 ^b	3.5 ^a	0.7 ^a	0.7 ^a	0.7 ^a	0.7 ^a	0.7 ^a	0.71 ^a
Ferulic	2.7 ^b	4.0 ^a	1.2 ^b	1.3 ^a	1.3	1.4 ^a	1.2 ^b	1.4 ^a
Vanillic	2.5 ^b	4.7 ^a	2.4 ^b	2.8 ^a	2.1 ^a	2.2 ^a	1.6 ^b	2.1 ^a
Chlorogenic	323 ^b	543 ^a	259 ^b	276 ^a	276 ^b	302 ^a	209 ^b	295 ^a
Rutin	3.2 ^b	6.0 ^a	1.2 ^a	1.12 ^a	1.2 ^a	1.1 ^a	1.1 ^a	1.2 ^a

Value are mean (n=6). Data in the same column followed by the same letter are not different ($P<0.05$).

Table 3. Nematicidal activity of rutin on juveniles (J_2) of *Nacobbus aberrans* and *Meloidogyne incognita* after 48 h of exposure.

Concentration	Percent mortality (%)	
	<i>N. aberrans</i>	<i>M. incognita</i>
5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	14 ^c	9 ^b
50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	25 ^b	11 ^{ab}
500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	46 ^a	15 ^a

Value are mean (n=6). Data in the same column followed by the same letter are not different ($P<0.05$).

Antibrowning washing agents effect to preserve quality of minimally processed *Vicia faba* seeds

Efecto de agentes antipardeantes en semillas de haba mínimamente procesadas en fresco para preservar su calidad

M. Otón^{*1}, F. Artés^{1,2}, F. Artés-Hernández^{1,2}

¹ Instituto de Biotecnología Vegetal (IBV). Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). Campus Muralla del Mar. 30202 Cartagena, Murcia, Spain.

² Grupo de Postrecolección y Refrigeración. Dpto. Ingeniería de Alimentos. ETSIA, UPCT. P^º Alfonso XIII, 48. 30203. Cartagena, Murcia, Spain.

Abstract

Several antibrowning agents (ascorbic acid, peroxyacetic acid and ethylene diamine tetra acetic-EDTA) were tested to prevent browning in the washing step of minimally processed *Vicia faba* seeds. In a first test, antibrowning agents were applied in an industrial process by washing for 2 min and rinsed for 1 min, if necessary, in combination with 2 polypropylene (PP) films to generate a modified atmosphere (MA) during 10 days at 4±1 °C. These films were bi-axially orientated PP -BOPP- and PPlus®. Considering the results of this test, a second test was made in the UPCT facilities. An OPP film was used for packaging after washing with the antibrowning agents during a shelf life of 9 days at 4±1 °C. The water temperature in all cases was 5 °C. At industrial scale, the MA generated was inadequate, which induced quality deterioration of the seeds. However under controlled conditions in the UPCT facilities, the atmosphere stabilization was enough to preserve the quality. It will be needed to control the parameters at industrial scale.

Keyword: Fresh-cut; wash water; quality; browning.

Resumen

Se ensayaron diversos agentes antipardeantes (ácido ascórbico, ácido peroxiacético y ácido etilen diamino tetra acético-EDTA) para prevenir el pardeamiento en semillas de haba mínimamente procesadas en fresco. En primer lugar, se aplicaron los diferentes antipardeantes descritos en una línea de procesamiento industrial, lavando 2 min a 5 °C y enjuagando 1 min, si era necesario, en combinación con 2 films a base de polipropileno (PP) para generar una atmósfera modificada (AM) durante 10 días a 4±1 °C. Dichos films fueron PP biorientado -BOPP- y PPlus®. Tras los resultados obtenidos, en un segundo ensayo, realizado en la UPCT, se usó un único film (BOPP) durante 9 días a 4±1 °C. En todos los casos la temperatura del agua de lavado fueron 5 °C. En el ensayo a escala industrial, la AM no fue adecuada, perjudicando la calidad de las habas. Sin embargo, en condiciones controladas en la UPCT existió una estabilización de la atmósfera y se mantuvo la calidad de las habas. Se necesitará profundizar en el control de parámetros a nivel industrial.

Palabras clave: IV gama; *Vicia Faba*; calidad; pardeamientos.

* E-mail: mariano.oton@upct.es

1. INTRODUCCIÓN

En un intento por encontrar una alternativa al lavado con hipoclorito sódico (NaClO) como agente antipardeante [1] y antimicrobiano [2], se evaluaron diversas soluciones acuosas durante la etapa del lavado. Además se aprovechó para estudiar la eficacia de diferentes polímeros [3] para generar y optimizar una atmósfera modificada (AM) con el formato de tamaño y peso de producto requerido por la empresa. El objetivo del trabajo fue determinar la evolución de la atmósfera con los polímeros utilizados y comprobar el efecto de los agentes antipardeantes combinados con las atmósferas generadas bajo los diferentes plásticos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La variedad de haba fue “Palenca” siendo realizada una parte del ensayo en las instalaciones industriales de FRUTAS ESPARZA y la otra en las de la UPCT. Las habas fueron preenfriadas a 5°C y se les realizó un prelavado tras la obtención de la semilla. Los tratamientos de lavado en solución acuosa a 5 °C fueron los siguientes:

- Ácido Ascórbico: lavado con 20 ppm de ácido ascórbico + 20 ppm de ácido cítrico + 100 ppm de NaClO (2 min; pH = 6,8)
- EDTA: lavado con 250 ppm de ácido Etilen Diamino Tetra Acético-EDTA- (2 min; pH = 6,41)
- Ácido Peroxiacético(PAA): peróxido de hidrógeno (0,03%) + ácido acético (0,1%) (2 min; pH = 4,16)
- NaClO: Lavado con agua clorada con 100 ppm de NaClO + 20 ppm de ácido cítrico (1 min; pH=6,7) + 1 min de enjuagado con agua a 5 °C. Utilizado como testigo convencional.

Tras el escurrido, 200 g de habas se envasaron en bolsas formadas a base de los siguientes films:

- BOPP: Polipropileno biorientado de 35 µm de espesor. Permeabilidad al O₂ y CO₂ según fabricante 1100 cm³ m⁻² d⁻¹ atm⁻¹ a 23 °C y 0% HR (Plásticos del Segura, Murcia, España)
- PPLUS-160: Polipropileno de 35 µm de espesor con microperforaciones realizadas por láser de la marca comercial PPLUS adaptado para productos de elevada intensidad respiratoria aunque no han aportado su permeabilidad.
- PPLUS-210: similar al anterior con mayor permeabilidad

Tras lo visto, los tratamientos que se utilizaron en el ensayo industrial fueron:

- Lavado con ácido ascórbico/ EDTA/ ácido peroxiacético
- Envasado con BOPP/ PPLUS-160/ PPLUS-210

Mientras que los que se utilizaron para el ensayo en la UPCT fueron:

- Lavado con NaClO/ ácido ascórbico/ EDTA/ ácido peroxiacético
- Envasado con OPP. Permeabilidad al O₂ y CO₂ según fabricante 900 cm³ m⁻² d⁻¹ atm⁻¹ a 23 °C y 0% HR (Plásticos del Segura, Murcia, España)

En todos los casos se realizaron 5 repeticiones por tratamiento, que se dispusieron en oscuridad para su conservación durante 9 días en el ensayo industrial y 10 días en la Universidad a 4±1 °C. A continuación se detallan los análisis y determinaciones.

2.1. Determinación de la composición gaseosa

Se determinó la concentración de O₂, CO₂ y etileno en el interior de los envases con semillas de haba bajo atmósfera modificada (AM) durante la vida comercial refrigerada. Se usó un cromatógrafo de gases (ThermoFinnigan GC, Milán, Italia) provisto de un detector de conductividad térmica.

2.2 Análisis sensorial

Se evaluó la calidad sensorial de las habas durante su vida comercial por un panel de catadores de ambos sexos, compuesto por miembros del GPR-UPCT, con edades comprendidas entre 25 y 60 años, en un número nunca inferior a 5 [4].

2.3. Análisis microbiológicos

Para comprobar que se cumple la legislación vigente [6], en las muestras desarrolladas en la Universidad, se tomaron tres réplicas de 30 g de habas que se introdujeron en bolsas estériles, junto con 270 mL de una solución de agua de peptona. Se llevaron a un digestor (Masticator, IUL Instruments, Barcelona, España) durante 60s. A partir de esta solución se preparó una batería de diluciones que se sembraron en placas Petri, disponiéndose en cada una de ellas 20 mL del medio de cultivo adecuado en cada caso. La carga microbiana se expresó como log UFC g⁻¹.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Evolución de la atmósfera en las bolsas

En la Fig. 1A vemos una excesiva modificación de la atmósfera desde el primer día de conservación, por lo que para no entrar en anaerobiosis, se hizo necesaria la realización de una perforación de 0,52mm de ϕ en las bolsas con BOPP desde el primer día. En la Fig. 1B se observa cómo los lavados no modificaron la evolución de la atmósfera. Pero viendo cómo se comportaron las bolsas elaboradas en la empresa, se creyó necesario practicarle una perforación similar, alcanzándose el equilibrio prácticamente desde el primer día de conservación obteniendo unas presiones parciales que podemos calificar como aceptables (4-7 kPa O₂ y 17-22 kPa CO₂).

3.3. Análisis sensorial

Los tratamientos en la empresa ofrecieron una apariencia visual y unos pardeamientos similares, sin que ninguno de los tratamientos antipardeantes ensayados en la empresa consiguiese inhibir completamente el moderado pardeamiento de las semillas al finalizar los 9 días de conservación a 4±1 °C. . En los realizados en la Universidad hubo una homogeneidad en los resultados de todos los agentes antipardeantes, llegando en buen estado al final de la conservación, similar a lo sucedido con el NaClO. Se observó una apariencia visual aceptable, calificada como en el límite de consumo encontrando entre leves y moderados pardeamientos y con leves deshidrataciones sin diferencia entre tratamientos.

3.3. Análisis microbiológico

No se detectó la presencia de bacterias patógenas de acuerdo a la legislación vigente [5]. En la Fig. 2 se representa el recuento de enterobacterias, y total de aerobios mesófilos, como indicadores de alteración del producto. En ambos casos no se consideran valores excesivamente altos tras 9 días a 4±1 °C.

Respecto al comportamiento del resto de tratamientos antipardeantes alternativos al empleo de NaClO, se ha visto que no hay una mejora, ya que los recuentos de enterobacterias ha presentado una contaminación menos acusada en el tratamiento de NaClO, siendo, en cambio, el ácido peroxiacético, el que presenta menores recuentos en mesófilos.

4. CONCLUSIONES

Los tratamientos antipardenates en las condiciones aplicadas en el ensayo industrial no han preservado la calidad de las semillas de habas mínimamente procesadas en fresco. Por su parte, bajo condiciones controladas en el ensayo de la UPCT, se alcanzó una AM de equilibrio adecuada y una calidad sensorial aceptable tras 10 días a 4 ± 1 °C.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Frutas Esparza S.A. y al proyecto europeo EUROLEGUME FP7-BBBE.2013.1.2-02 la financiación recibida.

6. REFERENCIAS

- [1] Artés, F., Castañer, M., Gil, M.I. (1998). Enzymatic browning in minimally processed fruit and vegetables. Food Sci. Tech. Int. 4(6): 377-389.
- [2] Artés, F., Gómez, P.A., Aguayo, E., Escalona, V.H., Artés-Hernández F. (2009). Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. Postharvest Biol. Technol. 51, 287-296
- [3] Lin, Y.J., Dias, P., Chen, H.Y., Hiltner, A., Baer, E. (2008). Relationship between biaxial orientation and oxygen permeability of polypropylene film. Polymer. 49 (10): 2578-2586.
- [4] Ibañez, F.C. (2001). Parámetros y medidas en el análisis sensorial. En: F.C. Ibañez Moya y Y. Barcina (Ed.), Análisis sensorial de alimentos. Barcelona: Springer-Verlag Ibérica, pp 49-61.
- [5] Regulation EC 1441/2007. (2007). Commission regulation on microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of the European Union L. 322, 12-29.

Figuras

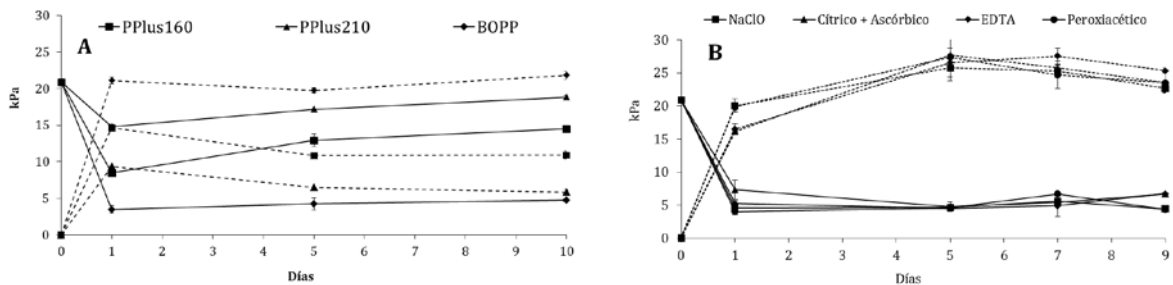


Figura 1. A) Evolución de la atmósfera durante 10 días a 4 ± 1 °C en bolsas de semillas de haba MPF bajo diferentes films. B) Evolución de la atmósfera durante 9 días a 4 ± 1 °C en bolsas de OPP tras distintos tratamientos de lavado. Las líneas continuas representan los kPa de O₂ mientras que las discontinuas representan CO₂.

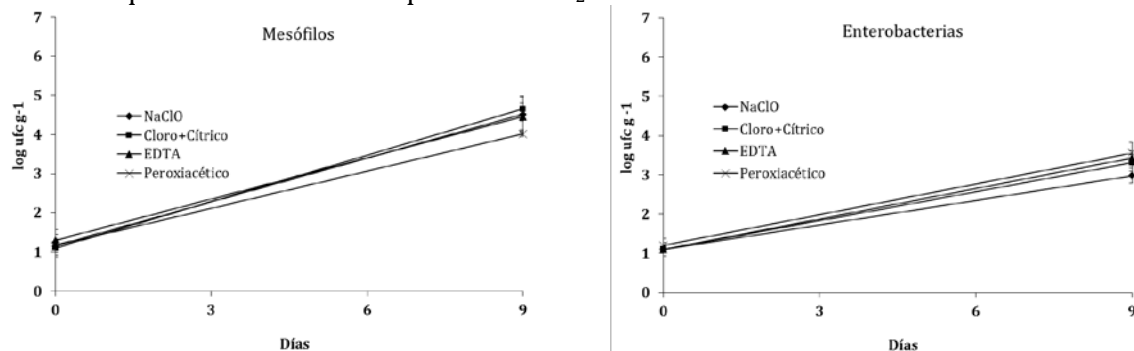


Figura 2. Recuento microbiano de microorganismos mesófilos y enterobacterias en semillas de habas mínimamente procesadas en fresco envasadas en bolsas de OPP tras 9 días a 4 ± 1 °C.

Seasonal effect on selected quality traits of a melon near-isogenic line

Efecto de la campaña en atributos de calidad seleccionados de una línea casi isogénica de melón

M. Zarid*¹, J. P. Fernández-Trujillo^{1,2}

¹ Department 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.

² Institute of Plant Biotechnology, CMN, UPCT, Plaza del Hospital s/n, E-30202. Cartagena, Murcia, Spain.

Abstract

Fruit quality in melon (*Cucumis melo* L.) is an important criterion for consumer's acceptance. Melons development and ripening process are linked to a series of biochemical and physiological changes. This work compared aroma compound classes of a melon near-isogenic line (NIL) SC7-2 during two seasons (S1, S2). The goal of this work was tracking the seasonal influence on the volatiles as potential biomarkers of textural differences (especially flesh firmness) due to introgression in melon LG VII. S2 with a better growing conditions compared with S1 resulted in enhanced quality traits with a slightly lower flesh firmness. Differences between seasons were that the percentage of total acetate esters and other compounds increased in S2, while the percentage of aldehydes, alcohols or alkanes typical of non-climacteric melons diminished. We hypothesize that acetate esters were biosynthesized in non-climacteric melons at a higher extent when growing conditions were favourable.

Keywords: Texture; aroma volatiles; environmental effect.

Resumen

La calidad del fruto de melón (*Cucumis melo* L.) es un criterio importante para la aceptación por parte del consumidor. El desarrollo del fruto y el proceso de maduración están vinculados a una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos. Este trabajo compara clases de compuestos químicos del aroma del fruto de melón de una línea casi isogénica (NIL) SC7-2 durante dos campañas (S1, S2). El objetivo de este trabajo fue determinar la influencia de la campaña en el uso de los volátiles como potenciales biomarcadores de diferencias de textura (especialmente firmeza de la pulpa), debido a la introgresión en el melón LG VII. En la campaña S2, con mejores condiciones ambientales para el desarrollo del fruto en comparación con S1, se obtuvo un fruto con mejores atributos de calidad en general y con una firmeza de pulpa ligeramente inferior. Las diferencias entre temporadas fueron que el porcentaje de ésteres de acetato totales y otros compuestos aumentaron en S2, mientras que el porcentaje de aldehídos, alcoholes o alcanos típicos de los melones no climatéricos disminuyó. Nuestra hipótesis es que la biosíntesis de ésteres de acetato aumentó en los melones no climatéricos en mayor medida cuando las condiciones de crecimiento fueron favorables.

Palabras clave: Textura; aromas volátiles; efecto ambiental.

* E-mail: m.zarid@gmail.com

1. INTRODUCTION

The quality of the melon is composed of features that provide value or degree of excellence for the consumer, being firm flesh texture and good flavor and essential nutritional value. The melon aroma is key in the perception of fruit quality perceived by consumers, and is due to a mixture of compounds of different degree of volatility [1]. The near-isogenic line SC7-2 has been studied previously due to its interest for improving melon flesh firmness associated with cell wall modifications compared with its "Piel de sapo" parental [2].

This work try to elucidate the quality of melons in their postharvest supply chain as part of our breeding strategies to improve the crop overall quality. Particularly, will gain knowledge based on near-isogenic lines (NILs) of melons and the genetic map of melon [1], a model system where many quantitative trait loci have been identified useful for postharvest purposes, with emphasis on multidisciplinary studies involving quality traits, physiological and biochemical studies, and modelling.

2. MATERIALS AND METHODS

The melon near-isogenic line (*Cucumis melo* L.) SC7-2 was obtained through interbreeding led by molecular markers between a Korean variety "Songwhan Charmi" PI 161375 (SC) and the Spanish cultivar type T111 "Piel de Sapo"(PS) [1]. Melon cultivation was under Mediterranean conditions in Torre Pacheco (Murcia, Spain). According to the Information System of Murcia (SIAM) the average temperature and precipitation from April to July, were 71,30mm/21,19°C for Season 1 and 24,60mm/21,04°C for Season 2 [6]. The plot design was randomized and the number of replicates was 7 for the NIL, collecting a minimum of 2 fruits per replicate. The physiological behavior is determined and the pulp firmness was measured with a 4.6 mm diameter punch with a testing machine. For the analysis of volatile juice pulp mixed with a saturated calcium chloride solution fruit, (the mixture containing 71.5% of filtered juice) and subsequently analyzed in a gas chromatograph equipped with a mass spectrometer under the method of solid phase microextraction headspace [1]. The chromatograms integration, the individual compounds analysis, the separation of aroma groups by chemical compounds, and quantification of results by percent of total area counts, were conducted. A one-way ANOVA analysis of the quality traits using season as factor and separating means by a Tukey test (P=0.05) was performed using 5.1 software (SAS Institute Inc., Cary, NC).

3. RESULTS AND DISCUSSION

The S1 did not reach the optimum quality for melon due to raining and sub-optimum temperatures during the growing season compared with S2. This is in part in agreement with differences in quality traits of the melon near-isogenic line SC7-2 in S2 compared with S1, particularly higher levels of soluble solids, juice yield, dry matter and slightly lower firmness (Table 1).

After calculating and comparing the mean percentage of each compound class depending on the season (Table 1) aldehydes followed by alcohols were predominant. Unidentified compounds and compounds typical of the fiber or column bleeding were not considered for Table 1 but did not shown significant differences between seasons. In S2 significant higher levels of acetate esters and other compounds were found concomitant with lower levels of alcohols, alkanes, etc. (Tables 2) The induction of higher levels of acetate esters are typical differences among climacteric versus non-climacteric cultivars of melons [3], but we found here some evidences of potential induction of the biosynthesis of certain acetate esters at high levels also in

non-climacteric types. Among these types of esters ethyl acetate; isopropyl acetate; 1-Butanol, 3-methyl-, acetate, and n-propyl acetate, in agreement with results in climacteric NILs [3]. Also other esters were important in season 2 from other types such as sulfur derived esters (methyl thiolacetate; methyl 2-(methylthio)), also important in climacteric NILs [3].

Fruits with climacteric behaviour have a short shelf-life and higher aroma levels than non-climacteric fruits, because some aroma compounds are produced almost exclusively by ethylene-dependent pathway. In climacteric genotypes, the volatiles reported are mostly esters and sulfur-derived ester compounds [5], and here we found also these types particularly in the second season (Table 2). On the other hand, the melon non-climacteric near-isogenic line SC7-2 show an important aroma level. So, we can develop a good melon variety in terms of quality, shelf-life and aroma.

The fruit melon quality can be affected by many factors, and the seasonal effect is mostly associated with environmental effects but also cultivar x environment effect, for example at the nutritional level. In fact the insufficient or excessive potassium level adversely affects fruit quality, while adequate K nutrition is associated with increased yields, fruit size, increased soluble solids and ascorbic acid concentrations, improved fruit color, increased shelf life, and shipping quality of many horticultural crops [4]. SC7-2 has been reported also having some problems of cracking [5], probably due to firm texture and therefore some limits to get the best potential texture and flavor should be studied in the future for non-climacteric melons with enhanced texture.

4. CONCLUSIONS

A better growing season in the melon near-isogenic line SC7-2 enhanced most of the quality traits analyzed but modified the proportion of compound classes. We hypothesize that acetate esters were enhanced in seasons with better growing conditions for melons even in non-climacteric types.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support was provided by Fundación Séneca de la Región de Murcia (11784/PI/09) & MINECO & UE-FEDER funds (AGL2010-20858). M.Z was supported by the UE-Mundus program. We acknowledge the assistance of P. Varó & his team in CIFEAT-Torre Pacheco (Consejería de Agricultura, Región de Murcia) for crop management, to M.J. Roca (SAIT-UPCT) and L. Llanos, M.M. Jowkar, Y. Piñeros, P. Jiménez, R. Pérez Reverte, J.M. Obando, and N. Dos-Santos for the technical assistance, and IRTA-CRAG for the seeds of the NIL.

6. REFERENCES

- [1] Dos-Santos, N., Bueso, M.C, 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.
- [2] Dos-Santos, N., Jiménez-Araujo, A., Rodríguez-Arcos, R., Fernández-Trujillo, J.P. (2011). Cell wall polysaccharides of near-isogenic lines of melon (*Cucumis melo* L.) and their inbred parentals which show differential flesh firmness and physiological behaviour. *J. Agric. Food Chem.* 59, 7773-7784.
- [3] Chaparro-Torres, L., 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 Agric.* 96, 2352-2365.
- [4] Tang, M., Zhao, H., Bie, Z., Li, Q., Xie, J., Shi, X., Yi, H., Sun, Y. (2012). Effect of different potassium levels on growth and quality in two melon cultivars and two growing-seasons. *J. Food. Agric. Environ.* 10, 570-575.
- [5] Fernández-Trujillo, J.P., Lester, G., Dos-Santos, N., Martínez, J.A., Esteva, J., Jifon, J.L., Varó, P. (2013). Pre- and postharvest muskmelon fruit cracking: causes and potential remedies. *HortTechnol.* 23, 266-275.

[6] Sistema información agrario de Murcia (SIAM): <http://siam.imida.es/apex/f?p=101:46:1053892687272425>

Tables

Table 1. Fruit quality traits (means \pm SE, n=7) of the melon near-isogenic line SC7-2. Means followed by different letter within rows were significantly different between seasons according with a Tukey test (P=0.05).

	Season 1		Season 2	
Quality trait				
Soluble Solids ($^{\circ}$ Brix)	9.2	± 0.1 a	12.0	± 0.1 b
Flesh firmness (N)	11.5	± 0.2 a	9.3	± 0.1 a
Juice yield (% W/W)	17.7	± 0.8 a	32.7	± 0.2 b
Dry matter (% w/w)	10.1	± 0.1 a	12.9	± 0.1 b
Juice density (kg/ m ³)	1019.0	± 1 a	1023.0	± 2 a

Table 2. Selected aroma volatile group of compounds by season (mean of total area counts \pm SE, n=7) of juice obtained from fruit of the near-isogenic line of melon SC7-2. Means followed by different letter within rows were significantly different between seasons according with a Tukey test (P=0.05).

Quality trait	Season 1		Season 2	
Acetate ester	4.0	± 1.0 a	17.6	± 3.4 b
Non-acetate ester	3.3	± 0.6 a	2.0	± 0.6 a
Aldehydes	27.2	± 4.0 a	20.1	± 3.3 a
Alcohols	10.6	± 2.9 a	6.9	± 1.1 b
Ketones	6.1	± 1.4 a	3.9	± 0.7 a
Acids	0.4	± 0.1 a	0.0	± 0.0 b
Sulfur derived compounds	4.5	± 1.3 a	1.8	± 0.9 a
Terpenes	0.1	± 0.1 a	0.0	± 0.0 a
Alkanes.				
Hydrocarbon				
Aliphatic	1.6	± 0.2 a	0.6	± 0.1 b
Others	1.6	± 0.2 a	13.1	± 2.2 b

Vitamin C and microbial quality of minimally fresh processed pea seeds stored in modified atmosphere packaging

Vitamina C y calidad microbiológica de semillas de guisante mínimamente procesadas en fresco envasadas en atmósfera modificada

E. Collado^{*1}, E. Armero², F. Artés-Hernández^{1,3}, E. Aguayo^{1,3}, F. Artés^{1,3}, J.A. Fernández^{1,4}, P.A. Gómez¹

¹Instituto de Biotecnología Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). Campus Muralla del Mar s/n. 30202. Cartagena, Spain. ²Área de Producción animal. Dpto. de Ciencia y Tecnología Agraria. UPCT. P^o Alfonso XIII, Cartagena, 30203, Spain. ³Grupo de Postrecolección y Refrigeración. Dpto. Ingeniería de Alimentos. UPCT. P^o Alfonso XIII, 30203. Cartagena, Spain. ⁴Departamento de Horticultura. UPCT. P^o Alfonso XIII, 30203, Cartagena, Spain.

Abstract

Peas (*Pisum sativum* L.) are an important source of protein, carbohydrates, vitamins and minerals. Due to their very high respiration rate, loss of quality is fast. There is very little information about the optimal storage conditions for immature pea seeds, which are well adapted to be prepared as a minimally processed product. The objective of this research was to analyze the microbial quality and changes in vitamin C of fresh pea seeds stored at 1 and 4 °C in modified atmosphere packaging (MAP) (OPP 25 µm). Seeds were disinfected with sodium hypochlorite (HS) (100 ppm, pH 6.5) or with acidified sodium chlorite (CSA) (300 ppm, pH 1.8). After 14 days, the atmospheres within the packages were 8 kPa CO₂/12 kPa O₂ and 11 kPa CO₂/10 kPa O₂ at 1 and 4 °C, respectively. Mesophilic growth was reduced when samples were stored at 1 °C, regardless of the disinfectant, while enterobacteria were reduced in all the treatments. Vitamin C decreased from \cong 700 mg kg⁻¹ fw to 250 or 450 mg kg⁻¹ fw, for HS and CSA respectively. Disinfection with CSA and storage at 1 or 4 °C allowed to obtain a good quality product after 14 days.

Keywords: *Pisum sativum*; legume; safety; nutrition; quality.

Resumen

Los guisantes (*Pisum sativum* L.) son una fuente importante de proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales. Debido a su alta tasa respiratoria, se deterioran rápidamente. Existe muy poca información sobre las condiciones óptimas de almacenamiento de semillas de guisantes inmaduras, pese a su conveniencia para utilizarse como producto mínimamente procesado. El objetivo de este trabajo fue analizar la calidad microbiológica y los cambios en la vitamina C de semillas inmaduras almacenadas a 1 y 4 °C en atmósferas modificadas (PPO 25 µm). Las semillas se lavaron con hipoclorito sódico (HS) (100 ppm, pH 6,5) o con clorito sódico acidificado (CSA) (300 ppm, pH 1,8). Después de 14 días, la atmósfera alcanzada fue de 8 kPa CO₂/12 kPa O₂ y 11 kPa CO₂/10 kPa O₂ a 1 y 4 °C, respectivamente. El crecimiento de mesófilos se redujo con la conservación a 1 °C, independientemente del desinfectante utilizado, mientras que las enterobacterias decrecieron en todos los tratamientos. La vitamina C disminuyó desde \cong 700 mg kg⁻¹ pf hasta 250 o 450 mg kg⁻¹ pf, para HS y CSA respectivamente. El lavado con CSA y almacenado a 1 °C ó 4 °C proporcionó un producto de buena calidad después de 14 días.

Palabras clave: *Pisum sativum*; leguminosas; seguridad; nutrición; calidad.

* E-mail: ecm3@alu.upct.es

1. INTRODUCCIÓN

El consumo de legumbres es menor en Europa que en otras regiones del mundo. La posibilidad de utilizar legumbres frescas, peladas y listas para comer como un alimento mínimamente procesado, facilitaría su uso, adaptándose a los cambios sociales, económicos y culturales que se orientan hacia una alimentación más sana.

Los guisantes (*Pisum sativum* L. var. *Saccharatum*) destacan por su alto contenido de proteínas, la presencia de hidratos de carbono de asimilación lenta, minerales (calcio, hierro, zinc), fibra (soluble) y algunos componentes bioactivos. Así, está demostrado que su consumo ayuda en la prevención y control de enfermedades crónicas tales como la diabetes, la hipercolesterolemia, diferentes cardiopatías y el cáncer [1]. La mayoría de los estudios postcosecha realizados sobre los guisantes frescos se ocupan de la vaina entera, pero hay muy poca información sobre las condiciones óptimas de almacenamiento de semillas de guisantes inmaduras, las que podrían prepararse como un producto mínimamente procesado.

El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos del lavado con HS (100 ppm, pH 6,5) y CSA (300 ppm, pH 1,8) y envasado en atmósfera modificada (AM) pasiva, sobre la calidad microbiológica y el contenido de vitamina C de semillas de guisante frescas en su almacenamiento durante 14 días a 1 y 4 °C.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

El material vegetal (guisantes var. Lincoln) se recolectó en la segunda quincena de febrero de 2015. Los guisantes se pelaron manualmente en una sala desinfectada y climatizada a 8 °C y las semillas fueron mantenidas en agua fría (4 °C) hasta su inmersión durante 2 min en los distintos tratamientos de desinfección: HS (NaOCl 100 ppm, pH 6,5) y CSA (NaOCl₂ 300 ppm, pH 1,8). Posteriormente se realizó un enjuagado en agua fría de grifo durante 1 min.

2.2 Envasado

Se envasaron 125 g de guisantes en bolsas de OPP (35 µm de espesor, 15x15 cm). Una vez termoselladas se almacenaron a dos temperaturas (1 y 4°C). Se prepararon 5 repeticiones por tratamiento y día de evaluación. Las muestras fueron analizadas al inicio y tras 4, 8 y 14 días.

2.3 Análisis gaseoso en el interior de los envases

A lo largo de toda la vida útil del producto, se midió la composición gaseosa (O₂ y CO₂) dentro de los envases donde se generó la AM pasiva. Para su análisis, se extrajo 1 mL de muestra gaseosa del espacio de cabeza de los envases con una jeringuilla, a través de un septum de silicona colocado sobre el plástico, y se analizó en un cromatógrafo de gases. Las muestras se extrajeron los días 1, 3, 5, 7, 11, 12 de almacenamiento.

2.4 Análisis microbiológico

Para determinar el crecimiento microbiano (psicrófilos, mesófilos, enterobacterias, mohos y levaduras) se emplearon métodos de enumeración estándar [2]. Los resultados se expresaron como log UFC g⁻¹. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento y día de análisis.

2.5 Análisis de vitamina C

El contenido de vitamina C se calculó como la suma del ácido ascórbico (AA) y ácido dehidroascórbico (ADHA), de acuerdo con el método desarrollado por Martínez-Hernández et al. [3]. Los resultados se expresaron como g kg⁻¹ pf. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Composición gaseosa en el interior de los embases

Durante el primer día de almacenamiento hubo un incremento de la presión parcial de CO₂ y un descenso en la de O₂, alcanzándose un equilibrio a partir de ese día (8 kPa CO₂/12 kPa O₂ and 11 kPa CO₂/10 kPa O₂ para 1 y 4 °C, respectivamente). Esta atmósfera puede considerarse como apropiada para este producto [4].

3.2 Análisis microbiológicos

El crecimiento de mesófilos y psicrófilos tuvo una tendencia creciente, el cual fue menor a 1 °C (en mesófilos 2,89 ± 0,06 y 2,62 ± 0,14 log UFC g⁻¹ a 1 °C y 3,06 ± 0,05 y 2,99 ± 0,17 log a 4 °C en HS y CSA respectivamente (Fig. 1) y en psicrófilos 1,60 y 1,30 UFC g⁻¹ a 1°C y 3,10 y 2,99 a 4°C en HS y CSA respectivamente). El recuento de mohos y levaduras se mantuvo constante (2 log UFC g⁻¹), en tanto que no se detectaron enterobacterias en ningún tratamiento (< 1 log UFC g⁻¹). Después de 14 días, la calidad microbiológica fue adecuada según la Regulación EC 1441/2007 [5], obteniéndose mejores resultados a 1 °C, independientemente del desinfectante.

3.3 Vitamina C

Los niveles de vitamina C sufrieron un descenso a lo largo de la vida útil del producto en ambos tratamientos y a ambas temperaturas (de 707 a 267 mg kg⁻¹ pf en el tratamiento con HS a 1 °C y de 707 a 306 mg kg⁻¹ pf en HS a 4°C) (Tabla 1), aunque esta disminución fue menor en el caso del tratamiento con CSA (de 643 a 446 y 466 mg kg⁻¹ pf en CSA a 1 °C y 4 °C). Se observó que la mayor parte del contenido en vitamina C se debió al aportado por el ADHA (Fig. 2). La causa puede ser probablemente que, durante el procesado, las semillas de guisante sufren un estrés oxidativo que transforma el AA en ADHA. La disminución en el contenido de vitamina C puede deberse a que la tasa de cambios bioquímicos causados por procesos fisiológicos que a veces pueden incrementarse a bajas temperaturas [6]. Además se observó que la vitamina C se degradó en menor proporción cuando el tratamiento desinfectante utilizado fue el CSA.

4. CONCLUSIONES

La calidad microbiológica de los guisantes fue mejor 1 °C, independientemente del desinfectante utilizado. La vitamina C se degradó menos cuando se desinfectó con clorito sódico acidificado, el cual puede considerarse como una alternativa eficaz al hipoclorito sódico. Sin embargo, se necesita más investigación para estudiar sus efectos sobre otros importantes parámetros de calidad.

5. AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto EUROLEGUME (EU FP7 Research Project No. 613781) financiado por fondos de la Unión Europea dentro del 7º Programa Marco de Investigación, Desarrollo Tecnológico y Diseminación.

REFERENCIAS

- [1] Chuang, S.C., Norat, T., Murphy N., Olsen, A., Tjønneland, A. (2012). Fiber intake and total and cause-specific mortality in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. *Am. J. Clin. Nutr.* 96, 164–174.
- [2] Artés, F., Gómez, P., Artés-Hernández, F. (2007). Physical, physiological and microbial deterioration of minimally fresh processed fruits and vegetables. *Food Sci. Technol. Int.* 13, 177-188.

[3] Martínez-Hernández, G.B, Artés-Hernández, F., Gómez, P., Artés, F. (2013). Comparative behaviour between kailan-hybrid and conventional fresh-cut broccoli throughout the shelf-life. *Lebensm. Wiss. Technol.* 50, 298-305.

[4] Mohammed, W.M., Nasef, I., El-Seifi, S., Hassan, M., Rawia, I. (2015). Storability, shelf-life and quality assurance of sugar snap peas (cv. Super sugar snap) using modified atmosphere packaging. *Postharvest Biol. Tec.* 100, 205-211.

[5] Regulation EC 1441/2007. (2007). Commission regulation on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union L 322*, 12-29

[6] Martínez-Damián, M.T., Cruz-Álvarez, O., Colinas-León, M.T., Rodríguez-Pérez, J.E., Ramírez-Ramírez, S.P. (2013). Actividad enzimática y capacidad antioxidante en menta (*Mentha piperita* L.) almacenada bajo refrigeración. *Agronomía mesoamericana* 24, 57-69.

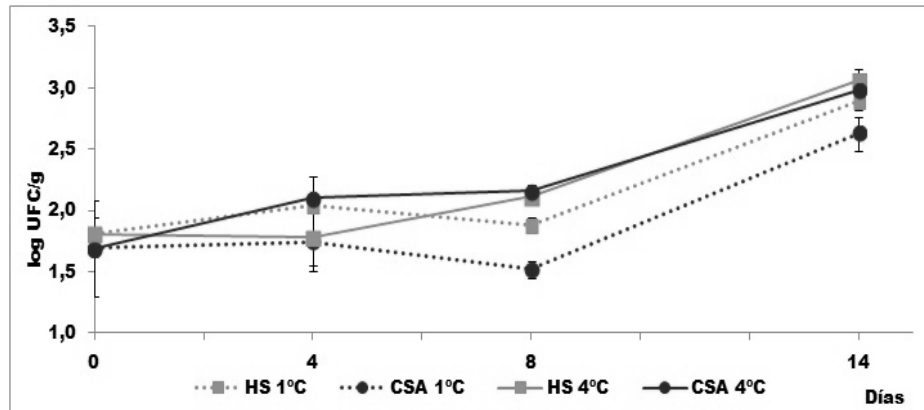


Figura 1. Recuentos de mesófilos en guisantes almacenados en atmósfera modificada pasiva, previamente desinfectados con NaOCl (HS) o NaOCl₂ (CSA)

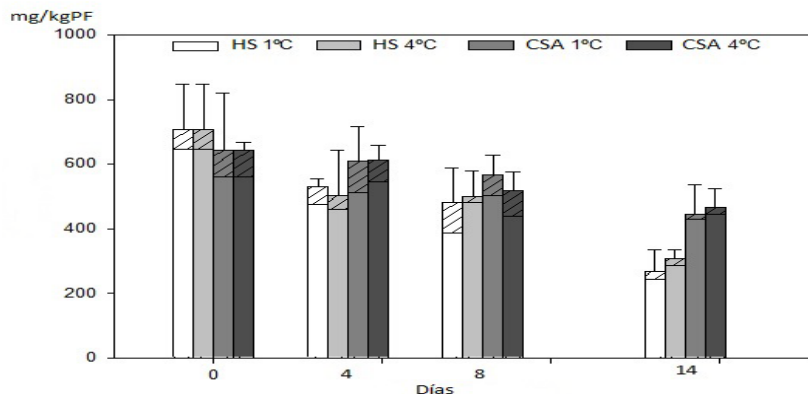


Figura 2. Vitamina C (□ DHA ▨ AA) en guisantes almacenados en atmósfera modificada pasiva, previamente desinfectados con NaOCl (HS) o NaOCl₂ (CSA). AA= ácido ascórbico, DHA= ácido dehidroascórbico (las barras indican la desviación estandar)

Tabla 1. Concentración de vitamina C (mg kg⁻¹ pf) en guisantes almacenados en atmósfera modificada pasiva, previamente desinfectados con NaOCl (HS) o NaOCl₂ (CSA).

TRATAMIENTO	DÍA 0	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
HS 1 °C	707,62 ± 141,52	530,12 ± 24,24	483,17 ± 106,72	267,68 ± 66,30
CSA 1 °C	643,47 ± 177,93	608,91 ± 108,58	566,98 ± 62,28	446,50 ± 90,78
HS 4 °C	707,63 ± 141,52	501,67 ± 142,60	498,92 ± 78,90	306,66 ± 29,06
CSA 4 °C	643,47 ± 24,24	611,65 ± 46,72	519,12 ± 56,50	466,55 ± 58,21

Continuous microwaving of an orange smoothie inhibits detrimental enzyme activity

Microondas en continuo para la destrucción de enzimas presentes en un batido vegetal

M. Arjmandi^{*1,3}, M. Otón², P. Gómez², F. Artés-Hernández^{2,3}, F. Artés^{2,3}, E. Aguayo^{2,3}

¹ College of Agriculture & Natural Resource. University of Tehran. Karaj. Iran.

² Institute of Plant Biotechnology - IBV. UPCT. Campus Muralla del Mar s/n. 30202. Cartagena, Spain.

³ Department of Food Engineering, Postharvest and Refrigeration Group, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203. Cartagena, Murcia, Spain.

Abstract

The effect of a pasteurization treatment at 90 ± 2 °C for 35 s, provided by continuous microwave (MWP) under different doses (low power/long time and high power/short time) or conventional pasteurization (CP) on the quality of orange smoothies was studied. A better color retention of the MWP-treated smoothie using high power/short time than in conventionally-processed sample was evidenced by the stability of the hue angle. The continuous MW heating increased the viscosity of the smoothie more than the CP in comparison with non-treated samples. Lower residual enzyme activities from peroxidase (POD), pectin methylesterase (PME) and polygalacturonase (PG) were obtained under MW heating, specifically when highest power/shortest time was used.

Keywords: Thermal process; viscosity; pasteurization; colour.

Resumen

Se ha estudiado el efecto de un tratamiento de pasteurización (90 ± 2 °C, 35 s) en un batido anaranjado de hortalizas. Este tratamiento térmico se aplicó con un microondas en continuo (MWP), utilizando diferentes dosis (baja potencia/tiempo largo y alta potencia/tiempo corto), comparándolo con un tratamiento térmico convencional (CP). Se logró una mejor retención del color (estabilidad del °hue), un incremento de la viscosidad y una mayor reducción de la actividad enzimática de peroxidasa, pectin metil esterasa y poligalacturonasa, en las muestras tratadas con MW, en particular, cuando se utilizaban los tratamientos de altas potencias y tiempos cortos.

Palabras clave: Tratamiento térmico; viscosidad; pasteurización; color.

1. INTRODUCTION

Vegetable smoothies are rich in bioactive compounds. The implementation of less aggressive heat treatments by the using of emerging technologies provides higher overall quality

* E-mail: mitra.arjmandi@ut.ac.ir

and extend shelf life. Industrial pasteurization is used for food preservation, and is primarily intended to inactivate naturally-found enzymes and destroy harmful pathogenic microorganisms to extend the shelf life of food products without compromising food safety [1]. Some of the enzymes involved in the changes in these quality parameters are peroxidase (POD), pectin methylesterase (PME) and polygalacturonase (PG). POD catalyzes the oxidation of a wide range of natural compounds, especially those containing aromatic groups [2]. PME and PG are involved in the breakdown of these pectins, causing cloud and viscosity losses of commercial products [3]. The inactivation of enzymes through microwave (MW), mainly in continuous-flow systems, is preferred for pasteurization over conventional heating because it allows the smoothies to keep their flavor and nutrients, having a longer shelf life [4]. The objective of this research was to compare, just after heat treatment, the effects of microwave (MWP) and conventional pasteurization (CP) on POD, PME and PG activities and related physical parameters, such as color and viscosity.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Sample preparation

After several preliminary compositional and sensory tests, an orange-colored smoothie was prepared with 126 g of tomato, 61 g of carrot, 29 g of pumpkin, 4 mL lemon juice, mineral water (50 mL) and 0.3 g marine salt. All ingredients were blended for 3 min in a thermomix.

2.2 Treatments

600 mL smoothies were treated by MW oven (Sairem Iberica S.L. SI-MAQ0101, Barcelona, Spain) under low power/long time (210 and 260 W for 646 and 608 s) and high power/short time (1,600 and 3,600 W for 206 and 93 s) or conventionally heated in a thermomix (CP). The final temperature in both methods was 90 ± 2 °C for 35 s.

2.3 Physical quality analysis

Color: Color of the samples was monitored by photo-colorimeter (Minolta CR-300, Ramsey, NJ, USA) and expressed as Hunter L*, a*, b* and hue angle ($h^0 = \tan^{-1}b^*/a^*$).

Viscosity: Viscous flow tests were determined in triplicate with a controlled shear rate/stress rheometer (AR G-2, TA Instruments, U.K) at 20°C.

2.4 Enzymes analysis

POD: It was measured using the method described by Elez-Martínez et al. [5]. The absorbance was measured at 509 nm for 10 min at 25 °C by using the Multiscan plate reader (Tecan Infinite M200, Männedorf, Switzerland).

PME: This enzyme activity was determined according to Ratner et al. [6] with slight modifications. The solution was adjusted to pH 7.0 with 1N NaOH and the pH was kept at 7.0 during 10 min using 0.01 N NaOH.

PG: It was measured according to Aguiló-Aguayo et al. [2] with slight modifications and quantified according to Gross [7].

2.5 Statistical analysis

Mean values (n = 3) were subjected to ANOVA and least significant difference test (LSD) at $p < 0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Color: The effects of both MWP and CP treatments on lightness (L^*) and hue angle (h°) of smoothie are illustrated in Table 1. L^* values increased after all the heat treatments. MWP-treated samples showed a slightly higher increase of L^* as compared to the CP processed and untreated smoothies. The use of MW, the combination of a high power dose (1,600 or 3,600 W) with shorter duration (206 or 93 s) improved L^* value of smoothies. According to the results, the h° value of the smoothie increased significantly after thermal treatment in comparison to untreated samples. Schiffmann [8] indicated that heat transfer is fast in MWP; for that reason, MWP is a technique that can be used to preserve the color of smoothies compared to CP.

Viscosity: Significant differences ($p < 0.05$) were found on the viscosity of the smoothies when pasteurized by MW or CP methods as compared to non-heated smoothies (Table 1). After treatment, the viscosity ranged from 80 to 59 Pa.s for MWP smoothies compared to 49 Pa.s for CP and 30 Pa.s for unheated samples. An increase in viscosity after heat treatments could be associated with a change in the pectin fractions [9]. These results agree with Vercet et al. [10] who reported that viscosity was strongly influenced by PME and PG activities, with the viscosity decreasing according to the different inactivation levels of these enzymes as we also found in this experiment.

Enzyme activity: Results indicate that both heating treatments were able to decrease the POD activity in smoothies. Just after treatment, MWP at highest power/shortest time diminished POD activity in the smoothies up to 96% and the CP treatment reduced the initial POD activity by 70%. (Table 2). These results agree with other authors, who have reported on the reduction of POD activity in conventional pasteurized tomato juice [2]. MWP reduced the PME activity more strongly than CP and maximum inactivation (92%) was reached using the highest power and shortest time (3,600 W/93 s), in comparison with the 81% PME reduction using 210 W for 246 s (Table 2). Nikdel et al. [11] reported that continuous MWP of orange juice resulted in a reduction of PME residual activity of 0.5-1.5% at temperatures greater than 75 °C for 10-15 s and 2.5% at 70 °C for 1 min. MWP with highest power/shortest time (3,600 W/93 s) also provided the best PG enzyme activity reduction (50%). In CP treatments, the enzyme's residual activity was of 69% (Table 2). Our results are similar to those reported by Aguiló-Aguayo et al. [2] who found that the residual PG activity decreased after a conventional heat treatment, reaching 78% and 56%, in tomato juice heated at 90 °C for 30 and 60 s, respectively.

4. CONCLUSIONS

Continuous MW heating increased the smoothie's viscosity more than conventional thermal treatment as compared to non-treated samples. The MWP treatments resulted in better color retention. A lower residual enzyme activity from POD, PME and PG was obtained under MW heating, specifically when using a highest power/shortest time.

5. ACKNOWLEDGMENTS

Thanks are due to the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and the European Regional Development Fund (MINECO-FEDER, AGL2013-48830-C2-1-R) for financial support.

6. REFERENCES

- [1] Abdullah, N., Chin, N.L. (2014). Application of thermosonication treatment in processing and production of high quality and safe to drink fruit juices. *Agric. Sci. Procedia* 2, 320-327.
- [2] Aguiló-Aguayo, I., Fortuny, S.R., Belloso, O.M. (2008). Comparative study on color, viscosity and related enzymes of tomato juice treated by high-intensity pulsed electric fields or heat. *Eur. Food Res. Technol.* 227, 559-606.

- [3] Kimball, D.A. (1991). Quality control and technology. Van Nostrand Reinhold, New York.
- [4] Ahmed, J. and Ramaswamy, H.S. (2007). Microwave pasteurization and sterilization of foods. In: Handbook of Food Preservation, 2th ed, M.S. Rahman, eds. (Taylor & Francis Group, LLC, Academic press, Brazil), p. 669-708,
- [5] Elez-Martínez, P., Soliva-Fortuny, R.C., Martín-Belloso, O. (2006). Comparative study on shelf life of orange juice processed by high intensity pulsed electric fields or heat treatments. Eur. Food Res. Technol. 222, 321-329.
- [6] Ratner, A., Goren, R., Monseline, S.P. (1969). Activity of pectin esterase and cellulase in the abscission zone of citrus leaf explants. J. Plant Physiol. 44, 1717-1723.
- [7] Gross, K.C. (1982). A rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying polygalacturonase using 2-cyanoacetamide. J. Hortic. Sci. 17, 933-934.
- [8] Schiffmann, R.F. (2001). Microwave processes for the food industry. In: Handbook of Microwave Technology for Food Applications, 1st ed, A.K. Datta, R.C. Anantheswaran, eds., (Marcel Dekker, R.C.,NJ, USA), p. 299-335.
- [9] Osorio, O., Martínez-Navarrete, N., Moraga, G., Carbonell, J.V. (2008). Effect of thermal treatment on enzymatic activity and rheological and sensory properties of strawberry puree. Food Sci. Technol. Int. 14, 103-108.
- [10] Vercet, A., Sanchez, C., Burgos, J., Montanes, L., López Buesa, P. (2002). The effects of thermosonication on tomato pectic enzymes and tomato paste rheological properties. J. Food Eng. 53, 273-278.
- [11] Nikdel, S., Chen, C.S., Parish, M.E., MacKellar, D.G., Friedrich, L.M. (1993). Pasteurization of citrus juice with microwave energy in a continuous-flow unit. J. Agric. Food Chem. 41, 2116-2119.

Table 1. Color parameters (lightness and hue angle) and viscosity in unheated (control), conventional (CP) and microwave pasteurized (MWP) smoothies.

Treatment	Color parameters		Viscosity Pa.s
	Lightness (L*)	Hue angle (h°)	
Non-treated	39.26 ± 0.23 ^e	50.36 ± 0.70 ^c	30.21 ± 0.01 ^f
CP	40.29 ± 0.15 ^d	53.29 ± 0.70 ^a	49.14 ± 0.05 ^e
MWP: 210 W, 646 S	40.86 ± 0.09 ^c	52.48 ± 0.55 ^{ab}	59.03 ± 0.01 ^d
MWP: 260 W, 608 S	40.94 ± 0.25 ^c	52.33 ± 0.26 ^{ab}	61.01 ± 0.02 ^c
MWP: 1600 W, 206 S	41.94 ± 0.04 ^b	51.77 ± 0.16 ^{abc}	72.01 ± 0.03 ^b
MWP: 3600 W, 93 S	42.89 ± 0.17 ^a	51.58 ± 0.47 ^{bc}	80.23 ± 0.05 ^a

*Values are mean ± standard error (n=3). Different letters in the same row indicate significant differences ($P < 0.05$).

Table 2. Residual peroxidase (POD), (PME) and (PG) activities enzyme in unheated (control), conventional (CP) and microwave pasteurized (MWP) smoothies.

Treatment	Residual enzyme activity (RA%)		
	POD	PME	PG
Non-treated	100 ± 0.00 ^a	100 ± 0.00 ^a	100 ± 0.00 ^a
CP	29.8 ± 0.5 ^b	26.74 ± 0.09 ^b	69.28 ± 0.38 ^b
MWP: 210 W, 646 S	8.5 ± 0.5 ^c	18.67 ± 0.09 ^c	57.48 ± 0.09 ^c
MWP: 260 W, 608 S	7.6 ± 0.5 ^c	17.38 ± 0.03 ^d	51.00 ± 0.72 ^d
MWP: 1600 W, 206 S	5.2 ± 0.5 ^d	11.32 ± 0.04 ^e	56.92 ± 0.46 ^c
MWP: 3600 W, 93 S	4.1 ± 0.6 ^d	7.89 ± 0.06 ^f	50.33 ± 0.57 ^d

*Values are mean ± standard error (n=3). Different letters in the same row indicate significant differences ($P < 0.05$).



ORAL SESSION II
Agrifood Biotechnology

Economic sensitivity analysis on the profitability of production of rabbit meat.

Análisis de sensibilidad económico sobre la rentabilidad de la producción de carne de conejo

A. Martínez-Bas*¹, E. Armero¹, M. Kessler²

¹Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria, Universidad Politécnica de Cartagena. Spain.

²Departamento de Matemática Aplicada y Estadística, Universidad Politécnica de Cartagena. Spain.

Abstract

In this project it was raised look for alternatives in the marketing of rabbit meat that gives added value and / or open the door to new markets and improve the profitability of farms. To perform the study, 2294 rabbits were selected at 8 weeks of age (male and female, one from each litter) three genetic lines (Ebro, Grimaud and Hyla), half of each of the lines fed a feed different (diet A and diet B) until they reached 16 weeks old trial ended. From the twelfth week in both males and females benefit ceases to be positive, because production costs outweigh the benefit obtained by rabbit. Therefore, in contrast to the results obtained in earlier chapters of growth, we adopt as optimal slaughter the eleventh, as genetic line Ebro week and as the most energy diet (B), both males and females. Furthermore, this benefit will be supplemented by the sale of processed products with high added value for which intra and inter-fats be exploited.

Keywords: production costs; selling price; profit.

Resumen

En el presente proyecto se planteó buscar alternativas en la comercialización de la carne de conejo que le den valor añadido y/o que le abra la puerta a nuevos mercados y mejore la rentabilidad de las explotaciones ganaderas. Para llevar a cabo el estudio, se seleccionaron 2.294 conejos a las 8 semanas de edad (machos y hembras, uno de cada camada) de tres líneas genéticas (Ebro, Grimaud e Hyla), la mitad de cada una de las líneas se alimentó con un pienso distinto (dieta A y dieta B), hasta que alcanzaron las 16 semanas de edad que finalizó el ensayo. A partir de la doceava semana tanto en machos como en hembras el beneficio deja de ser positivo, ya que los gastos de producción superan al beneficio obtenido por conejo. Por tanto, contrastando con los resultados obtenidos en capítulos anteriores de crecimiento, adoptamos como semana óptima al sacrificio la onceava, como línea genética Ebro y como dieta la más energética (B), tanto machos como hembras. Además este beneficio se complementará con la venta de productos transformados de alto valor añadido para los cuales se aprovecharán grasas intra e intermusculares.

Palabras clave: gastos de producción; precio de venta; beneficio.

1. INTRODUCCIÓN

El sector de la cunicultura está inmerso desde 2012 en dos crisis simultáneas. Una es la subida del precio del pienso que surge como consecuencia de la subida de los precios de las

* E-mail: anamartinezbas@hotmail.com

materias primas; y la otra surge por la inestabilidad en los precios de referencia en las lonjas que van ligados a los precios de venta al consumidor. Esta situación de doble crisis sectorial no se había producido anteriormente [1] y la alternativa para asegurar la sostenibilidad de las explotaciones cunícolas a medio y largo plazo es optimizar el rendimiento económico de las explotaciones.

Así, al comienzo de nuestro proyecto, fijamos como principal objetivo la optimización del proceso de crecimiento y cebo de conejos destinados al despiece y a la obtención de productos alternativos que abran la puerta a nuevos mercados. Para ello, se estudió la edad y peso al sacrificio: la edad al sacrificio estuvo comprendida entre las semanas 8 y 16, con una periodicidad de una semana, en las que se obtuvieron distintos pesos al sacrificio. Se diseñó un programa de alimentación: se ensayaron dos tipos de piensos de engorde con distintos niveles energéticos. Se investigaron tres líneas genéticas como machos finalizadores: Grimaud, Ebro e Hyla. Y se estudió la influencia del género: se engordaron tanto machos como hembras.

En nuestro estudio [2] observamos que la eficiencia alimentaria disminuye radicalmente a partir de la doceava semana; pero para la elaboración de ciertos productos de valor añadido (como longaniza, hamburguesas, bandejas con piezas nobles troceadas) es necesario obtener canales más pesadas de lo habitual. Con esta información, decidimos realizar un análisis de sensibilidad económico planteando diferentes hipótesis donde varían precios de pienso y precios de venta de carne para así complementar el estudio de crecimiento realizado anteriormente y fijar cuál es la semana óptima de sacrificio para la cual existe un beneficio económico.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Animales

2294 animales de tres líneas genéticas diferentes (Grimaud, Ebro e Hyla) fueron los participantes de este proyecto. Desde noviembre de 2012 hasta marzo de 2013, conejos con 7 semanas de edad fueron destetados y transportados a jaulas individuales.

2.2 Dietas

Tras el destete los animales fueron alimentados con dos tipos de pienso cuya formulación viene indicada en la Tabla 1.

2.3. Parámetros

Cada conejo se pesó semanalmente desde su destete hasta su sacrificio (PVS). Además se pesó el pienso consumido por comedero. Con estos datos se han calculado los siguientes parámetros:

Incremento de peso semanal (Incrém Peso). Incremento del peso en gramos desde el destete hasta el momento del sacrificio (entre 8 y 16 semanas de edad).

Índice de transformación (IT). Es el ratio entre los kilogramos de pienso respecto a los kilogramos de carne.

2.4. Análisis de sensibilidad económico

Debido a que los precios en el mercado cunícola no son lineales a lo largo de un año, se han comparado diferentes hipótesis con subidas de un 10% del precio del pienso, del precio de venta de la carne o de ambos simultáneamente. Así, las diferentes hipótesis se han aplicado a las tres líneas genética estudiadas, a los dos tipos de alimentación y comparando sexos.

En este caso, la hipótesis que más se acerca a la realidad de la situación vivida en 2012 según el ganadero de la explotación, según Rafel et al. [3] y según el estudio del Observatorio de Precios de los alimentos 2012 [4] fija el precio de venta de la carne de conejo tomando como referencia el

de la lonja de Bellpuig para el año 2012 que es de 1.85 euros/kg. Y el valor del precio de compra de los piensos 0.30 euros/kg. Incluyendo en el precio de alimentación los coccidiostáticos más los gastos de transporte, pero sin incluir la medicación ni los impuestos.

A partir de los datos del libro de contabilidad de la empresa se ha estimado el porcentaje del coste de alimentación, que es de 68%.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto de la línea genética para caracteres de crecimiento dio como resultado en estudios anteriores que la línea genética Ebro es la mejor en cuanto a velocidad de crecimiento. Además los conejos alimentados con el pienso más energético (B) presentaron un mejor índice de transformación y el efecto del género para caracteres de crecimiento en la evolución del peso fue muy parecido entre machos y hembras.

Como vemos en la Tabla 2, el PVS aumenta progresivamente paralelamente al aumento del IT; y un IT muy alto va directamente ligado a un gasto de producción total más alto. En nuestro caso a partir de la semana 12, cuando el IT supera el 5.5, la producción deja ser rentable, ya que los gastos de producción se disparan, y estos conejos necesitan comer más cantidad de pienso un kilogramo de carne.

Además a la semana 11 el crecimiento comienza a ralentizarse, como vemos semanalmente se ganan menos gramos de peso, 258.18 gramos en machos, 267.42 gramos las hembras coincidiendo con que hay menor consumo de pienso, 1255.92 gramos en machos y 1125.06 gramos en hembras.

4. CONCLUSIONES

Finalmente adoptamos la semana 11 como la óptima al sacrificio, con un beneficio de 0.7 € por macho y 0.6 € por hembra. Aunque descienda bruscamente el beneficio respecto a la semana anterior, es necesario llevar los animales a más edad para que aumenten las grasa intra e intermuscular y poder elaborar los productos transformados de alto valor añadido. Con la elaboración y venta de estos productos nuestra producción cunícola vuelve a ser rentable y puede sufragar los picos de producción y diferencias de precios de carne que tienen lugar cada año

5. AGRADECIMIENTOS

La realización del presente trabajo ha sido posible gracias al apoyo económico del proyecto CDTI (IDI-20120024) "Introducción de nuevos parámetros productivos en explotación cunícola para la obtención de productos de alto valor añadido". Agradecer también el apoyo técnico de la empresa QUIN s.l. y de mis compañeros del grupo de investigación. Así como a mis directores de tesis.

6. REFERENCIAS

[1] Fortun-Lamothe, L. (2007). Quelle est la durabilité de la production cunicole? Atouts et limites de conditions d'élevage actuelles. 12^{ème} Journées de la Recherche Cunicole, Le Mans, France, 27-28 novembre 2007, pp.: 155-165.

[2] Mtnez-Bas, A., Armero, E., Kessler, M. (2014). Evolución del crecimiento y de la eficiencia alimentaria en conejos de engorde en función de la línea genética, de la formulación de la dieta y el género. III Workshop de Investigación Agroalimentaria. 2014.

[3] Rafel, O., Ramon, J., Piles, M., (2012). Estrategias productivas en el sector cunícola ante una situación de crisis. XXXVIII Symposium de Cunicultura.

[4] Estudio de la cadena de valor y formación de precios del sector de la carne de conejo. Campaña 2010. Julio 2012. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.

Tabla 1. Composición nutricional de los dos tipos de pienso que utilizamos.

Composición nutricional (%)	Dieta A	Dieta B
Materia Seca	89	89
Proteína Bruta	15	16
Grasa Bruta	2.5	3
Fibra Bruta	25	17
Almidón	8	12
Fibra Ácido Detergente	25	22
Fibra Neutro Detergente	40	35
Cenizas	11	11
Energía Metabolizable (Kcal/kg)	2100	2400

Tabla 2. Beneficio por conejo de la semana 8 a la 16 de sacrificio, para la raza Ebro, dieta B y ambos sexos (1:Machos, 2: Hembras). Peso Vivo Sacrificio (PVS), Índice de Transformación (IT)

Semana	Sexo	n	PVS (Kg)	IT	Increm Peso (g/sem)	Consumo pienso (gramos/sem)	Precio Venta (1.85 e/kg)	Gastos pienso	Gastos producción totales	Beneficio por conejo
8	1	24	1,95	3,47			3,61		3,51	0,10
9	1	23	2,16	3,86	214,31	785,43	4,00	0,24	3,85	0,15
10	1	24	2,60	4,58	439,12	1853,35	4,81	0,56	4,67	0,14
11	1	20	2,86	5,14	258,18	1255,92	5,29	0,38	5,23	0,07
12	1	22	3,18	5,70	318,81	1729,06	5,88	0,52	5,99	-0,11
13	1	25	3,29	6,26	109,78	656,58	6,08	0,20	6,28	-0,19
14	1	23	3,54	6,82	246,61	1612,78	6,54	0,48	6,99	-0,45
15	1	24	3,74	7,38	200,73	1424,95	6,91	0,43	7,62	-0,71
16	1	0	3,85	8,04	111,30	857,72	7,12	0,26	8,00	-0,88
8	1	20	1,95	3,52			3,61		3,51	0,10
9	1	24	2,14	3,87	190,52	704,07	3,96	0,21	3,82	0,14
10	1	28	2,59	4,56	454,89	1918,19	4,80	0,58	4,67	0,13
11	1	21	2,86	5,09	267,42	1290,72	5,29	0,39	5,23	0,06
12	1	16	3,18	5,61	317,62	1699,65	5,88	0,51	5,98	-0,10
13	1	24	3,32	6,14	138,59	814,13	6,14	0,24	6,34	-0,21
14	1	26	3,54	6,66	220,73	1412,44	6,55	0,42	6,97	-0,42
15	1	24	3,77	7,19	231,54	1603,10	6,98	0,48	7,67	-0,70
16	1	4	3,92	7,71	151,09	1125,06	7,25	0,34	8,17	-0,92

Influence of climatic conditions on volatile emission in snapdragon (*Antirrhinum majus*)

Influencia de las condiciones ambientales en la emisión de volátiles en boca de dragón (*Antirrhinum majus*)

M.I. Terry*, J. Weiss, M. Egea-Cortines

Universidad Politécnica de Cartagena, Instituto de Biología Vegetal, Genética Molecular. Plaza del Hospital s/n, 30202, Cartagena, Spain.

Abstract

The circadian clock is a mechanism that provides adaptive advantages being present in all living organisms. The circadian clock in plants, as described in *Arabidopsis thaliana*, is comprised of a series of interlocked regulatory feedback loops, but there is not much information about its function on processes such as the emission of volatile organic compounds. In this study, we will analyze volatile emission under two different environmental conditions in snapdragon (*Antirrhinum majus*).

Keywords: biological rhythm; photoperiod; thermoperiod; time series.

Resumen

El reloj circadiano es un mecanismo que proporciona ventajas adaptativas y está presente en todos los organismos. El reloj circadiano en plantas, como se describe en *Arabidopsis thaliana*, está formado por una serie de bucles interconectados y retroalimentados, pero no existe mucha información sobre su función en procesos como la emisión de compuestos volátiles orgánicos. En el presente trabajo analizaremos la emisión de volátiles en dos condiciones experimentales (medio ambientales?) en la planta modelo boca de dragón (*Antirrhinum majus*).

Palabras clave: fotoperiodo; ritmo biológico; series temporales; termoperiodo.

1. INTRODUCCIÓN

El reloj circadiano es un mecanismo autorregulado y endógeno presente en la mayoría de los seres vivos, desde bacterias hasta humanos. Resultado de la alternancia del día y la noche, este reloj proporciona una serie de ventajas adaptativas. En plantas, según lo descrito en *Arabidopsis thaliana*, los componentes más importantes de este reloj son los genes *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)*, *LATE ELONGATE HYPOCOTYL (LHY)* y *TIMING OF CAB2 EXPRESSION 1 (TOC1)*. *CCA1* y *LHY* están estrechamente relacionados y su expresión máxima se produce durante el día. Por otro lado, *TOC1* se expresa durante la noche estableciéndose así un complejo sistema de tres bucles de retroalimentación junto con otros genes [1,2].

* E-mail: mitl0@alu.upct.es

La boca de dragón (*Antirrhinum majus*), perteneciente a la familia de las plantagináceas, es una planta ornamental de interés en investigación, que está usada como modelo en estudios de desarrollo floral [3,4], emisión y biosíntesis de volátiles [5,6] y pigmentos [7], entre otros. Sin embargo, no existe mucha información sobre la estructura del reloj circadiano en esta especie y su posible implicación en procesos tan importantes como el desarrollo y el crecimiento, la floración o la emisión de volátiles.

La emisión de compuestos orgánicos volátiles tiene entre otras funciones, atraer a polinizadores y repeler a herbívoros. Además, se sabe que la emisión de ciertos compuestos en la boca de dragón varía a lo largo del día [8] y que esta especie es polinizada durante el día por abejorros, atraídos por algunos de estos volátiles [9].

El objetivo de este trabajo es estudiar la emisión de volátiles en boca de dragón, analizar los posibles efectos de las condiciones ambientales y comprobar si la temperatura puede actuar como sincronizador en ausencia de un ciclo luz-oscuridad.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal y condiciones experimentales

Las semillas de la línea Sippe 50 de boca de dragón fueron germinadas en vermiculita. Se mantuvieron en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas de luz (L, *light*) y 8 horas de oscuridad (D, *dark*) y la temperatura fue de 23 °C y 18 °C, respectivamente.

Para la aclimatación de las plantas se introdujeron en cámaras de cultivo por un periodo de 15 días donde las condiciones fueron:

- a) Ciclo LD: 12L:12D, temperatura 23 °C y 18 °C.
- b) Ciclo LL: 12L:12L, temperatura 23 °C y 18 °C.

2.2 Volátiles

Los volátiles se recolectaron mediante el sistema SPME (solid phase microextraction) a las tres horas del encendido de las luces (*Zeitgeber Time*, ZT 3) y cada seis horas durante un ciclo de 24 horas [10].

Posteriormente, los *Twisters* fueron analizados en un GC-MS, la identificación de los compuestos se basó en una librería estándar (*Standard Reference Database 1A NIST 2005*).

2.3 Análisis de datos

Se seleccionaron cuatro de los volátiles con un porcentaje superior al 2% (Tabla 1). Para la detección de ritmos se usó el paquete RAIN (R) [11].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observaron cambios en los niveles de volátiles emitidos en el grupo de LD a lo largo del día. En esta especie se ha descrito que el ritmo en la emisión de volátiles persiste durante al menos 4 días, en condiciones de oscuridad o de luz continua [6, 8] lo que apoya que la emisión debe de estar regulada por el reloj circadiano; sin embargo, tras dos semanas de luz continua estas oscilaciones han desaparecido, pese a que sí existía un termoperiodo. En algunas plantas de interés agronómico bajo condiciones de luz continua se ha descrito que la existencia de un termoperiodo puede mitigar los daños causados por esta exposición [12, 13] pero no existen muchos datos sobre el efecto en el reloj circadiano.

Además, según los resultados obtenidos con RAIN, sólo uno de los volátiles, acetofenona en LL, mostró un ritmo en la emisión ($P = 0,034$) que no existe en condiciones de LD ($P = 0,209$). Este

compuesto tiene un importante papel como repelente de herbívoros [14] e influye en la polinización por parte de los abejorros, ya que resultan menos atraídos por dicho volátil [15].

Aunque se conoce que la emisión de volátiles puede aumentar con la intensidad lumínica [16], no tenemos datos sobre una exposición prolongada a la luz continua; en estas condiciones, la emisión ha sido menor en las plantas en LL (Figura 1).

4. CONCLUSIONES

Una oscilación periódica en la temperatura no parece ser suficiente para sincronizar la emisión de volátiles en luz continua.

La exposición prolongada en condiciones de luz continua podría tener un efecto no deseado sobre herbívoros y/o polinizadores.

La emisión de volátiles disminuye en condiciones de luz continua.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dr. María José Roca el soporte ofrecido con los análisis GC-MS. El trabajo se realiza dentro del proyecto MICINN BFU-45148-R.

6. REFERENCIAS

- [1] Huang, W., Perez-Garcia, P., Pokhilko, A., Millar, A. J., Antoshechkin, I., Riechmann, J. L., and Mas, P. (2012). Mapping the core of the Arabidopsis circadian clock defines the network structure of the oscillator. *Science*, 336(6077), 75-79.
- [2] McClung, C. R. (2014). Wheels within wheels: new transcriptional feedback loops in the Arabidopsis circadian clock. *F1000Prime Rep*, 6(2), 10-12703.
- [3] Coen, E. S., Romero, J., Doyle, S., Elliott, R., Murphy, G., and Carpenter, R. (1990). *Floricaula*: a homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell* 63(6), 1311-1322.
- [4] Sommer, H., Beltran, J. P., Huijser, P., Pape, H., Lönning, W. E., Saedler, H., and Schwarz-Sommer, Z. (1990). *Deficiens*, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors. *EMBO J.* 9(3), 605.
- [5] Dudareva, N., Martin, D., Kish, C. M., Kolosova, N., Gorenstein, N., Fäldt, J. and Bohlmann, J. (2003). (E)- β -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. *The Plant Cell* 15(5), 1227-1241.
- [6] Dudareva, N., Andersson, S., Orlova, I., Gatto, N., Reichelt, M., Rhodes, D. and Gershenzon, J. (2005). The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 102(3), 933-938.
- [7] Jackson, D., Roberts, K., and Martin, C. (1992). Temporal and spatial control of expression of anthocyanin biosynthetic genes in developing flowers of *Antirrhinum majus*. *The Plant J* 2(4), 425-434.
- [8] Kolosova, N., Gorenstein, N., Kish, C. M., and Dudareva, N. (2001). Regulation of circadian methyl benzoate emission in diurnally and nocturnally emitting plants. *The Plant Cell*, 13(10), 2333-2347.
- [9] Dudareva, N., Murfitt, L. M., Mann, C. J., Gorenstein, N., Kolosova, N., Kish, C. M. and Wood, K. (2000). Developmental regulation of methyl benzoate biosynthesis and emission in snapdragon flowers. *The Plant Cell* 12(6), 949-961.
- [10] Ruiz-Ramón, F., Águila, D. J., Egea-Cortines, M., and Weiss, J. (2014). Optimization of fragrance extraction: Daytime and flower age affect scent emission in simple and double narcissi. *Ind Crop Prod* 52, 671-678.
- [11] Thaben, P. F., and Westermarck, P. O. (2014). Detecting rhythms in time series with RAIN. *J. Bio. Rhythm* 0748730414553029.
- [12] Tibbitts, T. W., Bennett, S. M., and Cao, W. (1990). Control of continuous irradiation injury on potatoes with daily temperature cycling. *Plant Physiol* 93(2), 409-411.
- [13] Sysoeva, M. I., Shibaeva, T. G., Sherudilo, E. G., and Ikkonen, E. N. (2012, October). Control of continuous irradiation injury on tomato plants with a temperature drop. In VII International Symposium on Light in Horticultural Systems 956 (pp. 283-289).
- [14] Kergunteuil, A., Dugravot, S., Mortreuil, A., Le Ralec, A., and Cortesero, A. M. (2012). Selecting volatiles to protect brassicaceous crops against the cabbage root fly. *Delia radicum*. *Entomologia Exp Appl* 144: 69, 77.

[15] Suchet, C., Dormont, L., Schatz, B., Giurfa, M., Simon, V., Raynaud, C., and Chave, J. (2011). Floral scent variation in two *Antirrhinum majus* subspecies influences the choice of naïve bumblebees. *Behavior Ecol Sociobiol* 65(5), 1015-1027.

[16] Gouinguéné, S. P., and Turlings, T. C. (2002). The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. *Plant Physiol* 129(3), 1296-1307.

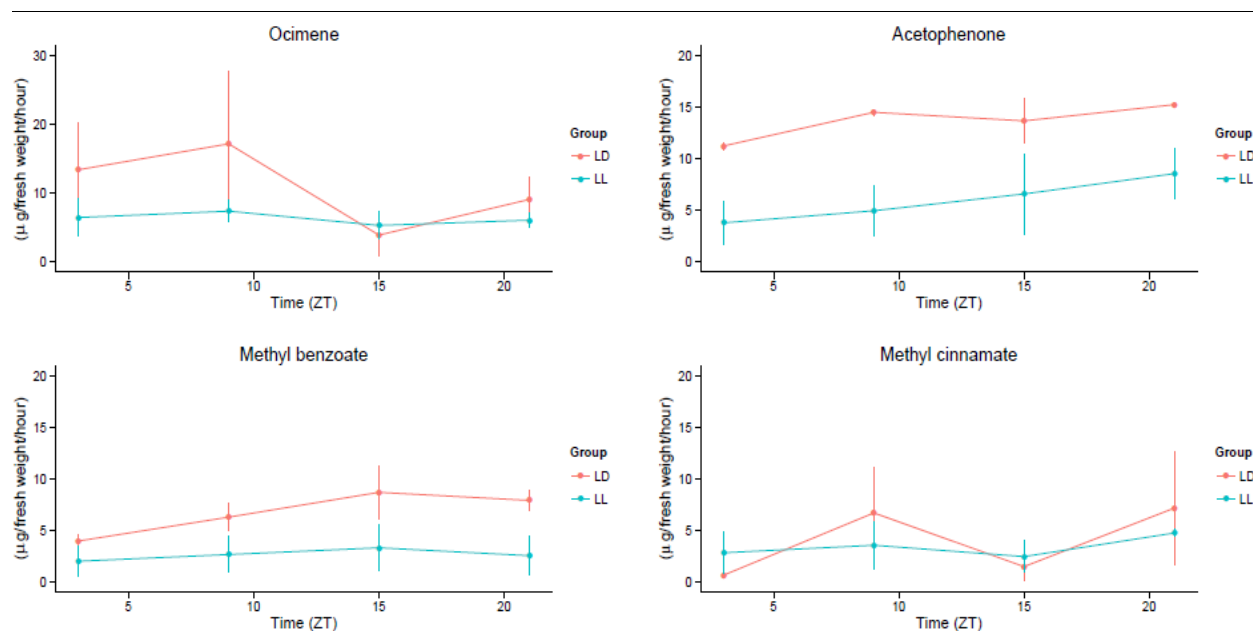


Figura 1. Volátiles emitidos, expresados como microgramos por gramo de tejido por hora a lo largo de 24 horas.

Tabla 1. Lista de volátiles analizados.

Volátil	CAS	RT
Ocimeno	3779-61-1	7,10
Acetofenona	98-86-2	7,48
Metil benzoato	93-58-3	8,04
Metil cinnamato	103-26-4	12,89

CAS: número de registro *Chemical Abstracts Service*, RT: tiempo de retención

Emisión circadiana de volátiles principales en *Antirrhinum majus*

Circadian emission of main volatile compounds in *Antirrhinum majus*

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

Genética Molecular, Plaza del Hospital s/n, Universidad Politécnica de Cartagena, 30202 Cartagena, Spain

Abstract

Plants communicate with their environment via the emission of aromas, which may be recognized by mutualist or antagonist animals. Studying these compounds has a wide interest, from the basic knowledge of interactions between organisms until the applicability in agriculture of repelling or attracting compounds for insects. Studies on these interactions can be performed in the model species *Antirrhinum majus*, whose flowers emit a complex mixture of volatiles. An important aspect when doing this studies is to determine the proper time for sampling. The objective of this work is to develop a guide for the proper sampling time depending on light conditions. To that end, we have taken volatile samples of flowers in a 12-12 h photoperiod of light-dark. We have analyzed the proportional emission of methyl benzoate, β -ocimene, acetophenone and β -myrcene. We found that while the emission of the two latter compounds is constant during day and night, methyl benzoate shows a peak of emission during the night and β -ocimene during the day. This means that the time when experiments are carried out is crucial and depends on the volatile that it is being studied.

Keywords: acetophenone; β -ocimene; methyl benzoate; β -myrcene

Resumen

Una de las herramientas que utilizan las plantas para comunicarse con su entorno son los aromas, que pueden ser reconocibles por animales mutualistas o antagonistas. El estudio de estos compuestos tiene un interés muy amplio, desde el conocimiento básico de las interacciones entre organismos hasta la aplicación en agricultura de compuestos repelentes o atrayentes de insectos. La especie modelo *Antirrhinum majus* permite avanzar en el estudio de estas interacciones debido a la emisión compleja de aromas florales. Un aspecto importante a la hora de realizar estos estudios es determinar el momento en el que se realizan los muestreos. Este trabajo pretende proporcionar una guía sobre el momento apropiado para la realización de muestreos en función de la luz. Para ello se han tomado muestras de volátiles de flores en un fotoperíodo de 12-12 h de luz-oscuridad. Se ha analizado la emisión proporcional de metil benzoato, β -ocimeno, acetofenona y β -mirceno. Se ha encontrado que mientras la emisión de estos dos últimos compuestos es invariable en función del día y la noche, metil benzoato se emite más durante la noche y β -ocimeno más durante el día. Resultando crucial el momento de realización de los experimentos en función del volátil objeto de estudio.

Palabras clave: acetofenona; β -ocimeno; metil benzoato; β -mirceno.

* E-mail: victoria.ruiz@upct.es

1. INTRODUCCIÓN

Antirrhinum majus es una especie modelo que se ha usado desde comienzos del siglo XX en diversos y abundantes estudios de biología de plantas. Debido a su característica flor, ha servido como modelo en trabajos sobre el desarrollo floral, la emisión de aromas y estudios sobre la relación polinizador-planta [1].

Los volátiles emitidos por las plantas, componen el interfaz químico de comunicación con el entorno en el que se encuentran. Así, las plantas utilizan sus colores y formas para atraer o repeler animales beneficiosos o perjudiciales. Pero también utilizan los compuestos químicos volátiles con numerosos fines, por ejemplo: ser más atractivas a polinizadores, repeler a plagas o comunicarse con otras plantas. Es por tanto un objeto de estudio importante en el ámbito de la agronomía y la ecología.

Por otra parte, los ritmos circadianos ejercen una gran influencia sobre el metabolismo de las plantas. Se conoce la variación de la emisión de aromas en función de la hora del día en flores [2, 3]. El objetivo de este trabajo es el de determinar la variación de la emisión de cuatro compuestos mayoritarios en flores de *Antirrhinum majus*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo ha consistido en el análisis de la variación de la proporción de la emisión de los compuestos principales del perfil aromático (metil benzoato 93-58-3, acetofenona 98-86-2, β -ocimeno 13877-91-3 y β -mirceno 123-35-3) de *Antirrhinum majus*. Esa variación se ha medido en función de las horas diurnas y nocturnas. Para ello se han tomado muestras en un periodo de 12 h de luz, 12 h de oscuridad y 24 h, con un fotoperíodo de 12-12 h.

2.1 Material vegetal

Se han utilizado flores de *Antirrhinum majus*, de la línea isogénica 165E. Se marcaron las flores el día 0 antes de la antesis y se tomaron las muestras el día 5^º después de la apertura total de la flor, ya que es el momento de máxima emisión de aromas en esta especie (resultados no publicados). Se han tomado tres flores independientes para cada repetición. Las plantas se encontraban previo al muestreo en un invernadero, con unas condiciones de luz y temperatura similares a las que tuvieron durante el muestreo.

2.2 Cromatografía

Las flores completas se introdujeron en un vaso de precipitado con 4 ml de una disolución de agua con glucosa al 5% y un portaobjetos que servía de apoyo para la flor. Sobre el filo del vaso de precipitado, se colocó un clip al adherido a un Twister™ que es una barra magnética cubierta de polidimetilsiloxano (PDMS) y permite la acumulación de compuestos químicos en espacio de cabeza. Estos vasos se encontraban en desecadores de 1 l en el interior de una cámara de crecimiento (modelo E8; Conviron). El fotoperíodo de las cámaras era de 12 horas de oscuridad y de luz. La temperatura osciló entre los 23 °C durante las horas de luz y los 18 °C en las horas de oscuridad.

El análisis de los compuestos volátiles acumulados en los Twister™ se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, tal y como se describe en [4]. Los compuestos detectados se identificaron por comparación con la base de datos NIST11. Las cantidades representadas están calculadas en porcentajes de emisión. Para ello, se han seleccionado los compuestos comunes en las tres réplicas y con ello se ha establecido un listado con el perfil aromático de las muestras. Sobre este listado se ha calculado el total de emisión y el porcentaje relativo que representa cada uno de los compuestos que se muestran en este estudio.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cuatro compuestos analizados en este estudio representan entorno al 65% de la emisión total de aromas en 24 h (Figura 1) y son los compuestos mayoritarios en flores de *A. majus* (24 h): β -ocimeno (Z) (53% \pm 14), acetofenona (33% \pm 1), metil benzoato (22% \pm 4) y β -mirceno (10% \pm 4). Estos resultados difieren de los encontrados en el cultivar de *Antirrhinum majus*, Maryland True Pink, en los que el volátil principal es metil benzoato [5]. Tanto β -ocimeno como β -mirceno, son monoterpenos. Mientras que acetofenona y metil benzoato pertenecen a la ruta metabólica de los fenilpropanoides. Tanto los fenilpropanoides, como los monoterpenos son compuestos que tienen diversas e importantes funciones en las plantas, desde la defensa vegetal o la atracción de polinizadores, hasta la comunicación planta-planta [6, 7].

Se conoce que la co-evolución entre plantas y polinizadores ha derivado en patrones de actividad acompasados. Por ejemplo, *Petunia hybrida* es polinizada por polillas y su emisión de aromas es mayor por la noche. Mientras que *Antirrhinum majus* es polinizada por abejas y su emisión es mayor durante el día (resultados no publicados). En la Figura 1 están los porcentajes de emisión de los cuatro compuestos mayoritarios estudiados durante las horas del día y la noche en un fotoperiodo de 12-12 h. En el caso de metil benzoato se observa que el porcentaje de emisión es mayor durante las horas de oscuridad que durante el día, a pesar de no ser una diferencia estadísticamente significativa. Además ocurre que la media de emisión durante las 12 h nocturnas es mayor que la de emisión de este compuesto en 24 h, una paradoja que podría deberse a la saturación de los Twisters™ y que induciría un error experimental. Este compuesto es considerado un atrayente de abejas [8], aunque existen estudios que no lo identifican como atrayente ni repelente de estos insectos [9]. Por otro lado, β -ocimeno se emite de manera significativamente mayor durante el día que durante las horas nocturnas. Este compuesto ha mostrado tener una actividad como atrayente de enemigos naturales en *Cucumis sativus* [9]. El otro monoterpeno estudiado ha sido β -mirceno, el cual ha presentado una emisión invariable a lo largo del día, al igual que ocurre con acetofenona que mantiene una emisión estable a lo largo del día. Este último compuesto se conoce por tener un efecto repelente sobre abejorros [10].

4. CONCLUSIONES

El campo de estudio que permite avanzar en el conocimiento de las relaciones animal-planta tiene un gran interés para la agronomía ya que existe un potencial de aplicabilidad muy importante, más allá del avance en el conocimiento básico de las relaciones entre estos dos reinos. Además del efecto aislado o conjunto de estos compuestos sobre mutualistas o antagonistas de plantas, debe de tenerse en cuenta la hora del muestreo ya que puede influir sobre las posteriores conclusiones.

5. AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio de Educación y Cultura por la beca de Formación del Profesorado Universitario (FPU13/03606). Este estudio se ha financiado en el marco del proyecto MCINN-FEDER BFU2010-15843. Además, quisiera agradecer su ayuda a M^a José Roca del Servicio de Apoyo a la Investigación Tecnológica (SAIT) de la UPCT.

6. REFERENCIAS

- [1] Périn, C., Hagen, L., Giovanazzo, N., Besombes, D., Dogimont, C., Pitrat, M. (2002). Genetic control of fruit shape acts prior to anthesis in melon (*Cucumis melo* L.). *Mol. Genet. Genomics* 266, 933-941.
- [1] Whitney, H. M., Milne, G., Rands, S. A., Vignolini, S., Martin, C., and Glover, B. J. (2013). The influence of pigmentation patterning on bumblebee foraging from flowers of *Antirrhinum majus*. *Naturwissenschaften* 100, 249-56.
- [2] Kolosova, N., Gorenstein, N., Kish C. M., and Dudareva, N. (2001). Regulation of circadian methyl benzoate emission

in diurnally and nocturnally emitting plants. *Plant Cell*, vol. 13, no. 10, pp. 2333–2347.

[3] Ruíz-Ramón, F., Águila, D. J., Egea-Cortines, M., and Weiss, J. (2014). Optimization of fragrance extraction: Daytime and flower age affect scent emission in simple and double narcissi. *Ind. Crops Prod.*, vol. 52, pp. 671–678.

[4] Manchado-Rojo, M., Delgado-Benarroch, L., Roca, M. J., Weiss, J., and Egea-Cortines, M. (2012). Quantitative requirements of *Deficiens* and *Globosa* for late petal development show a complex transcriptional network topology of B function. *Plant J.*, vol. 72, pp. 294–307.

[5] Dudareva, N., Murfitt, L. M., Mann, C. J., Gorenstein, N., Kolosova, N., Kish, C. M., Bonham, C., and Wood, K. (2000). Developmental regulation of methyl benzoate biosynthesis and emission in snapdragon flowers. *Plant Cell*, vol. 12, no. 6, pp. 949–961.

[6] Mahmoud, S. S., and Croteau, R. B. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. (2002). *Trends Plant Sci.*, vol. 7, no. 8, pp. 366–373.

[7] Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol. Plant*, vol. 3, no. 1, pp. 2–20.

[8] Horiuchi, J., Badri, D. V., Kimball, B., Negre, F., Dudareva, N., Paschke, M. W., and Vivanco, J. M. (2007). The floral volatile, methyl benzoate, from snapdragon (*Antirrhinum majus*) triggers phytotoxic effects in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, vol. 226, no. 1, pp. 1–10.

[9] Odell, E., Raguso, R. A., and Jones, K. N. (1999). Bumblebee foraging responses to variation in floral scent and color in snapdragons (*Antirrhinum* : *Scrophulariaceae*). *Am. Midl. Nat.*, vol. 142, no. 2, pp. 257–265.

[10] Suchet, C., Dormont, L., Schatz, B., Giurfa, M., Simon, V., Raynaud, C., and Chave, J. (2010). Floral scent variation in two *Antirrhinum majus* subspecies influences the choice of naïve bumblebees. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, vol. 65, no. 5, pp. 1015–1027.

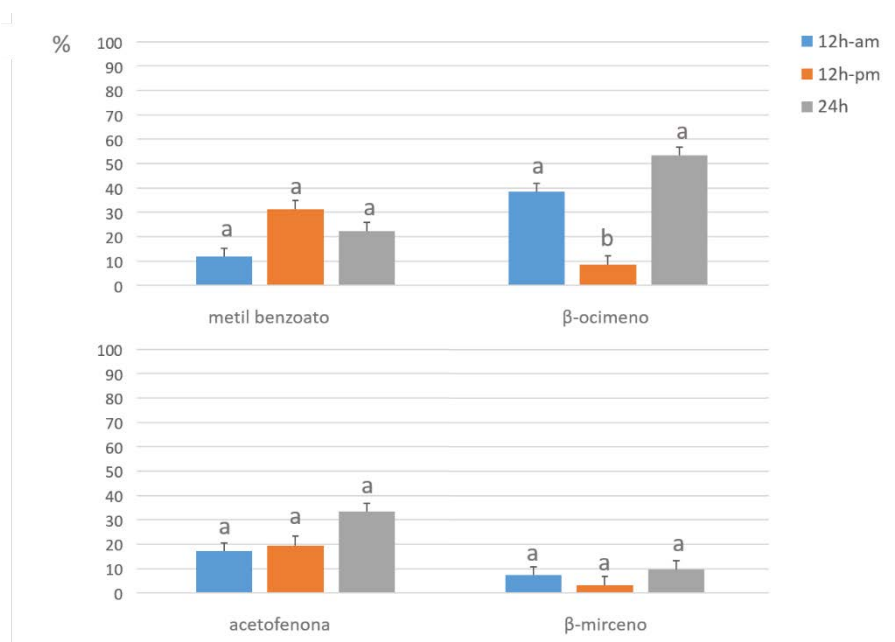


Figura 1. Emisión de los compuestos mayoritarios en *Antirrhinum majus*: metil benzoato, β -ocimeno, acetofenona y β -mirceno (media \pm ET; t-Student $p > 0,05$ las letras iguales no indican diferencias significativas)

Role of molecular markers in environmental studies on the example of the endangered species *Cistus heterophyllus*

Papel de los marcadores moleculares en los estudios ambientales: el ejemplo de la especie amenazada *Cistus heterophyllus*

M. Pawluczyk*, J. Weiss, M. Egea-Cortines

Genetics, Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena. 30202, Cartagena, Spain

Abstract

This study aims to analyse a set of molecular markers for tracing hybridization events in the population of an endangered species from the Cistaceae family, *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis* limited to only one natural population in the north-eastern Spain. In this population individuals with wild type and hybrid phenotypes, described before in Africa as *C. × clausonis*, co-occur, suggesting hybridization events between the endangered population and the locally abundant *Cistus albidus*. We applied plastid DNA and internal transcribed spacer (ITS) region of the ribosomal DNA as markers in the aforementioned population. We observed heteroplasmy for *rpoB* and *rpoC1* plastid genes in *C. heterophyllus* and the local *C. × clausonis*, but not in *C. albidus*. The ITS region was analysed in geographically isolated populations of *Cistus heterophyllus*, *Cistus albidus* and possible hybrids of these two species. Depending on the individual and population, *C. × clausonis* phylogenetically resembles more either *Cistus heterophyllus* or *Cistus albidus* and it might be related to the homogenization of variation between repeat types through concerted evolution.

Keywords: *Cistus*; molecular markers; plastid genes; ITS.

Resumen

Este estudio tiene como objetivo analizar un conjunto de marcadores moleculares para el rastreo de eventos de hibridación en la población de una especie en peligro de extinción de la familia Cistaceae, *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis* limitada a una sola población natural en el noreste de España. En esta población coocurren individuos con fenotipo silvestre y fenotipos híbridos, descritos antes en África como *C. × clausonis*, lo que sugiere eventos de hibridación entre esta población en peligro de extinción y una especie localmente abundante, *Cistus albidus*. Hemos aplicado marcadores plastídicos y la región interna inter-espaciada (ITS) de la ADN ribosómico como marcadores para su aplicación en la población mencionada. Observamos heteroplasmia en *C. heterophyllus* y *C. × clausonis* local, pero no en *C. albidus*. La región de ITS fue analizada en poblaciones geográficamente aisladas de *Cistus heterophyllus*, *Cistus albidus* y posibles híbridos entre estas dos especies. Dependiendo de individuo o población, *C. × clausonis* filogenéticamente parece más a *Cistus heterophyllus* o *Cistus albidus* y probablemente está relacionado a la homogenización de variación por evolución concertada.

Palabras clave: *Cistus*; marcadores moleculares; genes plastídicos; ITS.

* E-mail: marta.pawluczyk@gmail.com

1. INTRODUCTION

Molecular markers are a very powerful tool in environmental studies. They can be especially useful when investigating hybridization processes. However, it is not an easy task to find proper markers for rare species. In the situation of lack of sequence information about their genomes, the only solution are universal markers already described for other organisms. The most common plant universal markers are regions known as "DNA barcodes". Application of plastid noncoding DNA regions (*rbcL*, *trnK-matK*, *rpoB*, *rpoC1*) and plastid intraspecific regions (*trnL-F*, *trnH-psbA*) were already described by Chase [1] and Kress & Erickson [2,3]. It was suggested that these chloroplast markers could provide preliminary information of the extent and nature of population divergences and support comparative studies on population diversity [4]. Nuclear ribosomal DNA regions, in particular the internal transcribed spacer (ITS) region, are useful plant universal marker, especially in detecting hybrid relationships of generic and interspecific nature in flowering plants [5,6].

Cistus heterophyllus subsp. *carthaginensis* is an endangered species from the Cistaceae family. The unique natural population in Parque Regional de Calblanque, Monte de las Cenizas y Peña del Águila (Murcia) consists of 22 plants with two distinct morphologies: 12 individuals resemble what would be a pure *C. heterophyllus* subsp. *carthaginensis* type whereas 10 plants show an intermediate phenotype similar to hybrids described as *C. × clausonis* (*C. heterophyllus* × *C. albidus*) from northern Africa. As there are no exhaustive molecular studies for the *Cistus* family, we applied plastid and nuclear ITS markers in order to examine the hybridization events in the endangered species *C. heterophyllus* subsp. *carthaginensis*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Sampling of plant material

For the plastid marker experiment, plant material of *C. heterophyllus* (3 populations), *C. albidus* (5 populations) and *C. × clausonis* (2 populations) was collected. For the ITS marker studies, 114 individuals were collected: 25 individuals of *C. albidus* (10 populations), 70 individuals of *C. heterophyllus* (21 populations) and 17 individuals of *C. × clausonis* (4 different populations).

2.2 DNA extraction, cloning and sequencing

Total genomic DNA was extracted from plant material using a commercial kit according to the instruction manual. Selected DNA fragments were amplified under PCR conditions suitable for each primer. The primers used in this experiment have been described previously: plastid markers [2,3] and ITS [7]. PCR products were sequenced on an Abi Prism 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). PCR product for plastid markers were cloned before sequencing.

2.3 Real-time PCR, melting analysis for *rpoB* and *rpoC1* genes and identification of polymorphisms by restriction digestion

The loci *rpoB* and *rpoC1* were analyzed with the Mx3000P Q-PCR System using the SYBR Premix ExTaq™ (Takara Biotechnology, Dalian, China). To differentiate between *rpoC1* alleles A and B, PCR products of all sampled individuals were digested with ClaI restriction enzyme (Fermentas, Hanover, MD, USA).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Plastid markers

Noncoding DNA regions (*rbcl*, *trnK-matK*) were found as not variable enough to be informative in closely related individuals. Intraspecific regions (*trnL-F*, *trnH-psbA*) presented a high rate of evolutionary changes as indicated by their high variability. However, we found these markers as not sufficiently stable to give reliable information for the identification of wild type and hybrid individuals. Surprisingly, we observed heteroplasmy for *rpoB* and *rpoC1* genes in *C. heterophyllus* and the local *C. × clausonis*, but not in *C. albidus* (Fig.1).

We found two distinct alleles of *rpoB*, one present in all species and a second present only in *C. heterophyllus* and the local *C. × clausonis*. We also detected two alleles of *rpoC1*, one common to all species analyzed and a second present only in the local *C. × clausonis*. Our results show that there is a distinctive *rpoB* allele common to *C. heterophyllus* and *C. × clausonis* from Africa and Europe. The unique *rpoC1* allele found in the local *C. × clausonis* directs to a different origin of this small population, indicating that it is not a hybrid originating from *C. albidus* or *C. heterophyllus* currently present in this location.

3.2 ITS marker

The cladogram constructed based on the ITS sequence analysis with the outgroup *C. ladanifer*, *C. monspeliensis* and *C. laurifolios* surprisingly shows that the ITS sequence amplified from *C. heterophyllus* individuals collected in Llano de Beal did not place them on a common branch with another *C. heterophyllus* plant, but rather together with one of the hybrids (Fig.2). Another hybrid branched closely to a specific group of plants of *C. albidus* from Llano de Beal and a third hybrid took an obvious intermediate position between *C. heterophyllus* and *C. albidus* on a separate branch.

4. CONCLUSIONS

Among the plastid markers, we found the genes *rpoB* and *rpoC1* useful in differentiation between *C. heterophyllus* and *C. × clausonis* from *C. albidus*. The ITS marker analysis shows that, depending on the individual and population, *C. × clausonis* phylogenetically resembles more either *Cistus heterophyllus* or *Cistus albidus*. This situation might be a result the homogenization of variation between repeat types through concerted evolution.

5. ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the Comunidad Autónoma de la Región de Murcia Project “Molecular markers in conservation and management of the flora of Murcia Region”.

6. REFERENCES

- [1] Chase, M.W., Cowan, R.S., Hollingsworth, P.M., Peter, M., van den Berg, C., Madriñán, S., Petersen, G., Seberg, O., Jørgensen, T., Cameron, K.M., Carine, M., Pedersen, N., Hedderson, T.A.J., Conrad, F., Salazar, G., Richardson, J., Hollingsworth, M., Barraclough, T., Kelly, L., Wilkinson, M. (2007). A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon* 56, 295-299.
- [2] Kress, W.J., Erickson, D.L. (2007). A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcl* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE*, 2, e508.
- [3] Kress, W.J., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weigt, L.A., Janzen, D.H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102, 8369-8374.
- [4] Hajibabaei, M., Singer, G.A., Hebert, P.D., Hickey, D.A. (2007). DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends Genet.* 23, 167-172.

- [5] Buckler, E.S., Ippolito, A., Holtsford, T.P. (1997). The evolution of ribosomal DNA divergent paralogues and phylogenetic implications. *Genetics* 145(3), 821-832.
- [6] Hodač, L., Scheben, A.P., Hojsgaard, D., Paun, O., Hörandl, E. (2014), ITS polymorphisms shed light on hybrid evolution in apomictic plants: a case study on the *Ranunculus auricomus* complex. *PLoS One* 9(7).
- [7] White, T.J., Bruns, T., Lee, S.J.W.T., Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: *PCR protocols: a guide to methods and applications*, M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White, eds. (Academic Press, Inc., San Diego, California, U.S.A.), p.315-322.

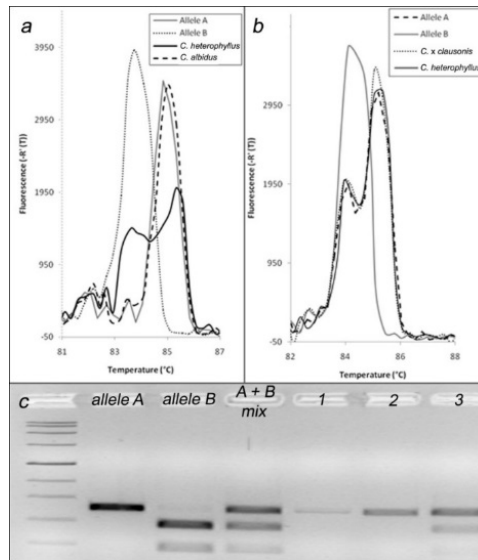


Figure 1. Melting curve qPCR analyses from of allele A and B of the *rpoB* gene present in *C. heterophyllum* individual. In *C. albidus* only allele A is present; b. Melting curve for *rpoC1* gene - allele A with double melting peak at 84.10 °C and 85.20 °C and allele B at 84.10 °C. Curve for *C. heterophyllum* without allele B and curve for *C. x clausonis* subsp. *carthaginensis* containing allele B; c. CAPS marker – *Clal* enzyme digested only samples containing allele B or mix of two alleles. Samples containing only allele A remain undigested

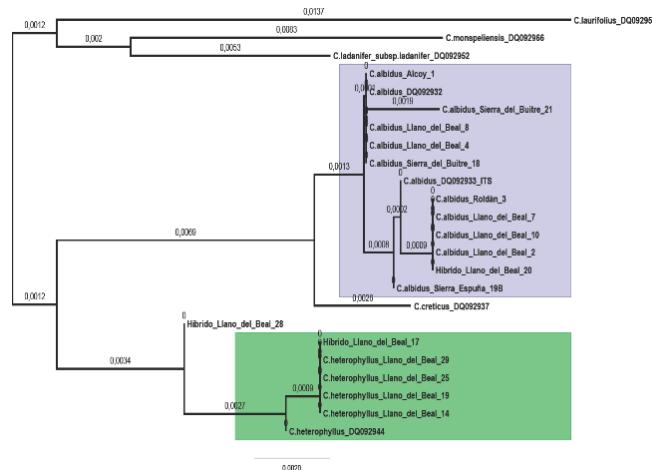


Figure 2. Cladogram of *C. heterophyllum* subsp. *carthaginensis*, *C. albidus* and *C. x clausonis* based on ITS region.

Genetic and environmental effects on the phenotypic structure of *Antirrhinum*

Efectos genéticos y medioambientales en la estructura fenotípica de *Antirrhinum*

R. Alcántud*, J. Weiss, M. Egea-Cortines

Departamento de Genética. Instituto de Biotecnología Agroalimentaria. Universidad Politécnica de Cartagena. 30202 Cartagena. Spain.

Abstract

Antirrhinum majus, has been used as a model plant in genetics since the beginning of the 20th Century. Species of *Antirrhinum* have also been used in studies of natural variation. We analyzed the segregation of phenotypic traits related to growth habit in the F3 of a cross between the isogenic line 165E of *A. majus* and trailing plants from *Antirrhinum linkianum*. These crosses were performed in the process of producing a RIL (Recombinant inbred line) population. We are studying their behavior in subsequent populations. Further segregation analysis is performed in backcrosses between selected trailing plants from the RIL population and *A. majus* 165E.

Keywords: Segregation; markers; PCR; trailing.

Resumen

Antirrhinum majus se ha utilizado como planta modelo en genética desde el principio del siglo XX. Varias especies de *Antirrhinum* se han utilizado también en estudios de variación natural. Hemos analizado la segregación de caracteres fenotípicos relacionados al hábito de crecimiento en la generación F3 de un cruce entre la línea isogénica 165E de *A. majus* y plantas tapizantes de *Antirrhinum linkianum*. Estos cruces fueron realizados en el proceso de generar una población RIL (Recombinant inbred line). Se está estudiando su comportamiento y segregación en retrocruces entre plantas tapizantes de la RIL y *A. majus* 165E .

Palabras clave: Segregación; marcadores; PCR; gravitropismo.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Hoy en día junto con *Arabidopsis thaliana*, *Antirrhinum* es uno de los modelos más utilizados para estudios genéticos en el análisis de genes involucrados en el desarrollo plantas. En la

* E-mail: raquelalcantudrodriguez@gmail.com

actualidad los protocolos de transformación y análisis fenotípicos están desarrollados en su totalidad.

En el presente trabajo aplicando estos protocolos, estamos utilizando las especies *Antirrhinum majus*, línea 165E y *Antirrhinum linkianum*. Se está realizando un seguimiento y observación de una población RIL (recombinant imbred line), resultando de un cruce entre estas especies de crecimiento erecto y tapizante para entender el modo de segregación y el número de genes involucrados en el hábito de crecimiento.

Desde la F₃ se realizará retrocruces entre plantas para generar la RIL son plantas de *Antirrhinum majus* 165E con el fin de observar la segregación en la siguientes generaciones e introducir este carácter en el fondo genético de *A. majus*. Este proceso, en conjunto con la aplicación de marcadores moleculares, nos va a permitir identificar secuencias concretas relacionadas al fenotipo tapizante.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

El material vegetal utilizado para generar la RIL son plantas de *Antirrhinum majus* 165E y *Antirrhinum linkianum*. A partir de la F₃ se realizaron retrocruces entre varias líneas independientes y la silvestre 165E. De esta población obtuvimos semillas para plantar la siguiente población segregante.

Las distintas líneas de ensayo del retrocruce, entre las que se realizó una selección, fueron: línea 165E x 25, línea 165E x 69-1, línea 165E x 69-2 y línea 69-1 x 165E.

2.2 Métodos

La primera población resultante de retrocruce (BC₁F₁) fue sembrada y cultivada inicialmente en vermiculita, en cámaras de cultivo y posteriormente en sustrato y en el invernadero. En la época de floración, se autopolinizaron las plantas, obteniendo nuevas semillas de las cuatro líneas anteriormente mencionadas, y se realizó una observación directa del fenotipo en estas poblaciones segregantes (BC₁F₂). Esta población se está cultivando y realizando extracciones de ADN y análisis de marcadores moleculares.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se especifica los porcentajes de plantas erectas y tapizantes (Figuras 1-3) observados en las diferentes poblaciones analizadas. En la población RIL F₃ se observó una segregación de 85% erectas y 15% tapizantes. En las 4 poblaciones (BC₁F₁) resultaron las segregaciones recogidas en la Tabla 1.

En la actualidad se han realizado investigaciones en otros cultivos como el maíz [3] en el que se ha localizado el gen relacionado al fenotipo tapizante, proporcionando información para nuestra investigación en forma de un gen candidato para *A. majus*

Existen dos mapas de recombinación molecular de *Antirrhinum majus* [4,5], resultando marcadores moleculares comunes a ambos mapas, que pueden ser utilizados en el mapeo de nuestro gen(es) de interés.

4. CONCLUSIONES

El seguimiento de segregación del fenotipo tapizante en poblaciones RIL entre *A. majus* y *A. linkianum* y en poblaciones de retrocruce, indica que el carácter está controlado por al menos un

gen recesivo. La aplicación de resecuenciado permitirá la clonación de dichos genes y su uso para otras plantas de interés industrial.

5. AGRADECIMIENTOS

Se agradece al departamento de Genética vegetal la colaboración de los doctorandos, y la tutela de los doctores Julia Weiss y Marcos Egea-Cortines.

6. REFERENCIAS

- [1] Manchado-Rojo, M., Delgado-Benarroch, L., Roca, M.J., Weiss, J., and Egea-Cortines, M. (2012). Quantitative requirements of Deficiens and Globosa for late petal development show a complex transcriptional network topology of B function. *Plant Journal* 72, 294-307. doi:10.1111/j.1365-313X.2012.05080.x
- [2] Navarro, P.J., Fernández, C., Weiss, J., and Egea-Cortines, M. (2012). Development of a configurable growth chamber with a vision system to study circadian rhythm in plants. *Sensor* 12 (11), 15365-15375.
- [3] Howard III, T.P., Hayward, A.P., Tordillos, A., Fragoso, C., Moreno, M.A., Tohme, J., Kausch, A.P., Mottinger, J.P., and Dellaporta, S.L. (2014). Identification of the Maize Gravitropism Gene *lazy plant1* by Transposon-Tagging Genome Resequencing Strategy. *PLoS ONE* 9(1):e87053. doi:10.1371/journal.pone.0087053.
- [4] Schwarz-Sommer Z., de-Andrade Silva E., Berndtgen R., Lonngig W.E., Muller A., Nindl I., Stuber K., Wunder J., Saedler H., Gubitza T., Borking A., Golz J. F., Ritter E., and Hudson A. (2003). A Linkage Map of an F2 Hybrid Population of *Antirrhinum majus* and *A. molle*. *Genetics* 163, (2), 699-710.
- [5] Schwarz-Sommer Z., Gubitza T., Weiss J., Gómez-di-Marco P., Delgado-Benarroch L., Hudson A., and Egea-Cortines M. (2010). A molecular recombination map of *Antirrhinum majus*. *BMC Plant Biol.* 10, (1), 275.
- [6] Mateu-Andrés, I. and De-Paco, L. (2006). Genetic Diversity and the Reproductive System in Related Species of *Antirrhinum*. *Ann. Bot.* 98, (5), 1053-1060.

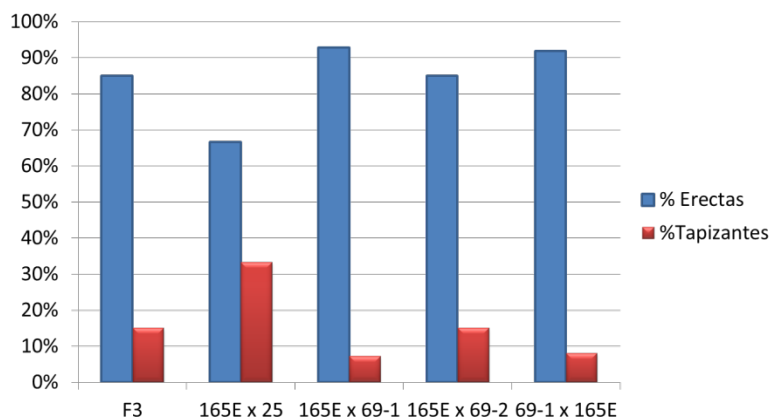


Figura 1. Porcentaje de *Antirrhinum* erectas y tapizantes.



Figura 2. Plantas de *Antirrhinum erectas*



Figura 3. Plantas de *Antirrhinum tapizantes*

Tabla 1. Segregaciones y Chi²

Muestra	Segregación erecta/Tapizante	(Chi ²)	X ²	P	3:1
F ₃	148/26	8,927	1	0,00281	No
165E x 25	30/15	1,9251	1	0,1653	3:1
165E x69-1	52/4	9,5238	1	0,002028	No
165Ex69-2	51/9	3,2	1	0,08364	3:1
69-1x165E	57/5	8,7943	1	0,003022	No

Effects of Pb⁺² on three populations of *Zygophyllum fabago*: Genotoxicity study

Efectos del Pb⁺² en tres poblaciones de *Zygophyllum fabago*: estudio de genotoxicidad

A. López-Orenes^{*1}, S. Silva², C. Santos², M.A. Ferrer¹, A.A. Calderón¹

¹Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria. Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena, Spain.

²Department of Biology and CESAM, Laboratory of Biotechnology and Cytomics, University of Aveiro, Campus Universitário de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal.

Abstract

Zygophyllum fabago is a succulent perennial shrub that is able to tolerate harsh environmental conditions prevailing in the southeastern Spain, where mine tailing ponds are scattered throughout the Sierra de Cartagena. However, despite being a pioneer species in the study area and produce a substantial amount of viable seeds, the rate of soil cover by this species in mine tailing ponds is low, probably because of adverse conditions in the area, especially high content of heavy metals. The main objective of this work is to assess the impact of applying a high lead concentration to *Z. fabago* plants from three different populations in the level of stress endured by the plants. Two genotoxicity assays (the comet assay and the micronucleus test) were carried out in order to evaluate the DNA damage induced by the heavy metal. Our results show that lead toxicity affects differently each population. This may be due to the different adaptation mechanisms developed to survive in any environment.

Keywords: lead; comet assay; micronuclei.

Resumen

Zygophyllum fabago es un arbusto perenne que es capaz de tolerar las duras condiciones ambientales prevalentes en el sudeste español, donde se localizan las balsas de estériles mineros que se encuentran dispersas por la Sierra de Cartagena. Sin embargo, a pesar de ser una especie pionera en estas balsas y de producir una considerable cantidad de semillas viables, la tasa de cobertura del suelo por esta especie en las balsas de estériles mineros es baja, debido a las condiciones adversas de la zona, sobre todo por los altos contenidos en metales pesados. El objetivo principal de este trabajo es evaluar el nivel de estrés soportado al aplicar plomo a plantas de *Z. fabago* procedentes de tres poblaciones distintas. El estudio se centra en determinar los daños de ADN debido a la presencia del metal pesado mediante los ensayos cometa y de micronúcleos. Los resultados obtenidos muestran que la toxicidad por plomo se manifiesta de forma diferente dependiendo de la población considerada, lo que sugiere que cada población pone en juego diferentes mecanismos de adaptación para sobrevivir a las condiciones específicas de cada entorno.

Palabras clave: plomo; cometas; micronúcleos.

* E-mail: antonio.orenes@upct.es

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación por metales del suelo es un problema en todo el mundo debido a los impactos ecológicos, ambientales y sobre la salud humana, además de que el aumento de los metales pesados en el medio junto con su elevada persistencia, favorecen su bioacumulación a lo largo de la cadena trófica. En concreto, el Pb es conocido por afectar negativamente a algunos criterios de valoración del desarrollo de las plantas como la tasa de germinación, el crecimiento y la masa seca de raíces y brotes. La mayor parte del Pb absorbido se encuentra en las raíces con sólo una pequeña fracción que es trasladada a los brotes.

Zygophyllum fabago L. es un arbusto perenne de la familia Zygophyllaceae. *Z. fabago* surge como un colonizador precoz de zonas alteradas en el sudeste de España, incluyendo suelos afectados por la actividad minera y, en muchos casos, altamente contaminados con Pb [1,2]. Por tanto es una especie prometedora para la restauración de las zonas contaminadas por metales, a pesar de que los mecanismos implicados en la tolerancia sean todavía en gran parte desconocidos. Este carácter pionero pone de relieve la importancia de la especie para el establecimiento de las denominadas "islas de vegetación" en zonas contaminadas, mejorando las condiciones del suelo y permitiendo la colonización posterior por otras especies de plantas [3]. Numerosos estudios han puesto de manifiesto las diferencias entre poblaciones metalíferas y no metalíferas de especies vegetales, y que las poblaciones de plantas pueden evolucionar en respuesta a las condiciones ambientales.

Los ensayos de cometas y de micronúcleos son técnicas muy útiles para estudiar la genotoxicidad de los metales pesados, ya que sirven para detectar daños en el ADN y se ha demostrado que estos metales (entre los que se incluye el Pb) causan efectos genotóxicos en exposiciones, relativamente, cortas [4].

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

Se obtuvieron semillas de *Z. fabago* procedentes de tres poblaciones, dos procedentes de sendas balsas de estériles mineros, denominadas "Agustín" y "Mercader", y otra población de una zona cercana degradada, todas ellas pertenecientes al Distrito Minero de Cartagena-La Unión (SE España). Las plantas se germinaron y cultivaron en semillero con perlita y se regaron con Hoagland (1/4) suplementado con 2 concentraciones de $Pb(NO_3)_2$ (0 y 20 μM) durante 4 semanas. Las plantas fueron cultivadas bajo un fotoperiodo de 16/8 h con 25/20 °C temperatura de día/noche, con una densidad de flujo de fotones de 470 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ PAR. Después de 4 semanas de tratamiento, las raíces se lavaron durante 10 min en 0,5 mM $CaSO_4$, y a continuación con agua destilada, se secaron con papel de filtro y, se dividieron las muestras en raíces y hojas.

2.2 Ensayo cometa

El ensayo de cometa se realizó según Gichner et al. 2004 [4], con ligeras modificaciones. Las hojas y raíces se cortaron en tampón frío Tris 0,4 M (pH 7,5), y los núcleos aislados se recogieron en el tampón. Se realizó una mezcla de 50 μL de la suspensión de núcleos y 50 μL de 1% de agarosa de bajo punto de fusión, y dicha mezcla se extendió sobre cada portaobjetos, el cual tenía agarosa de punto de fusión normal 1%. Los portaobjetos se sumergieron en un tampón alcalino (NaOH 0,30 M y EDTA 1 mM, pH > 13) para desenrollar el ADN (15 min) y la electroforesis a 0,74 V/cm y 300 mA durante 25 min a 4 °C. Las láminas fueron neutralizadas con tampón de 0,4 M Tris (pH 7,5) y se lavaron con agua. Los núcleos se tiñeron con bromuro de etidio y se examinaron bajo un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i) equipado con un filtro de excitación de 510 a 560 nm y un filtro de barrera de 590 nm. Las imágenes fueron capturadas con NIS Elements F 3.00, software SP7. La clasificación de los cometas se realizó según Avishai et al 2003 [5].

2.3 Micronúcleos (MNi)

Se obtuvieron tejidos meristemáticos de las raíces de plantas de *Z. fabago* y se tiñeron con yoduro de propidio. Se observaron las preparaciones a 400x utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i) con un filtro de excitación de 510-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm. Se siguieron los criterios de Fenech (2007) [6] para la identificación de MNi.

2.4 Análisis estadísticos

Los datos se presentan como la media de tres muestras de cada zona, con un mínimo de cuatro repeticiones por muestra. Todo los análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS (versión 19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos muestran un aumento general de daño del ADN en hojas y raíces de *Z. fabago* expuestas a Pb. En la Figura 1 se muestra la clasificación de los cometas [5] utilizada para la realización de la Tabla 1, donde se puede ver los valores numéricos que expresan ese incremento en el daño producido. La degradación del ADN inducida por Pb fue evidente por el ensayo cometa, en ambas partes, hojas y raíces expuestas a Pb. Así, además, encontramos diferencias entre los órganos hojas y raíces, donde el daño fue más acusado en las raíces debido seguramente al estar este órgano en contacto directo con el Pb y servir de barrera para el paso al resto de la planta, por lo que es de prever que el daño sea mayor en este órgano que en el resto de la plántula. Además se pudieron observar claras diferencias entre las diferentes poblaciones, las plantas pertenecientes a la balsa minera "Mercader" sufrieron menos daño del ADN, por lo tanto tendrían mecanismos de protección al daño ocasionado por el Pb, para impedir su degradación. A su vez, las plantas de la balsa de "Agustín" también se comportaron de la misma manera que las de "Mercader", pero con un menor grado de protección o mayor grado de degradación respecto a las plantas de "Mercader" (Tabla 1). Aunque algunos autores [7] señalan que el ensayo cometa no es un buen método para la monitorización de la genotoxicidad *in situ* en ambientes contaminados, en nuestro trabajo debido a las condiciones de cultivo y cómo se ha desarrollado el experimento, con dosis bajas de Pb, hemos podido comprobar que el ensayo cometa se puede aplicar con éxito para detectar daños en el ADN, incluso con una dosis baja de exposición, si se toma el cuidado apropiado. Por otro lado, no se encontró, a pesar del elevado número de células analizadas, la presencia de ningún MNi, por lo que la toxicidad de Pb en las raíces de estas poblaciones de *Z. fabago* no fue muy acusada.

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que los niveles de plomo afectan significativamente a la degradación de núcleos de las células de hojas y raíces de plántulas de *Z. fabago*. Además se puede observar que dependiendo de la población de partida los resultados son diferentes, siendo la población denominada Control más susceptible al plomo que las de "Agustín" y "Mercader", y a su vez, "Agustín" más que "Mercader", lo que conduce a verificar la hipótesis de partida de la diferenciación poblacional en la especie dependiendo de las condiciones presentes en el entorno. Esto podría deberse a una adaptación genética desarrollada por la planta para hacer frente a las condiciones ambientales presentes en las balsas de estériles mineros. Por tanto, implantando protocolos de revegetación con semillas o plantas procedentes de balsas de estériles mineros los resultados podrían ser muy esperanzadores, ya que las plántulas procedentes de parentales del pantano presentan mayor resistencia. Para ello, habría que evitar el primer paso de germinación y desarrollo de los primeros estadios de la plántula en las condiciones de los pantanos, con lo que las probabilidades de éxito del establecimiento y posterior desarrollo y colonización de las zonas degradadas serían mucho mayores.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el MECO (beca FPU AP2012/02559). Parte del trabajo se ha realizado en la Universidad de Aveiro (Portugal) gracias a la concesión de una ayuda para la movilidad del MECO (EST13/00414).

6. REFERENCIAS

- [1] Tordoff, G.M., Baker, A.J.M., Willis, A.J. (2000). Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous mine wastes. *Chemosphere* 41, 219–228.
- [2] Conesa, H.M., Faz, A. Arnaldos, R. (2006). Heavy metal accumulation and tolerance in plants from mine tailing of the semiarid Cartagena-La Union mining district (SE Spain). *Sci. Total Environ.* 366: 1-11.
- [3] Párraga-Aguado, I., Álvarez-Rogel, J., González-Alcaraz, M.N., Jiménez-Cárceles, F.J., Conesa, H.M., (2013a). Assessment of metal(loid)s availability and their uptake by *Pinus halepensis* in a Mediterranean forest impacted by abandoned tailings. *Ecol. Eng.* 58,84–90.
- [4] Gichner, T., Patková, Z., Száková, J., and Demnerová, K. (2004). Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mutat. Res.* 559, 49-57.
- [5] Avishai, N., Rabinowitz, C., and Rinkevich, B. (2003). Use of the Comet Assay for Studying Environmental Genotoxicity Comparisons Between Visual and Image Analyses. *Environ. Molecular Mutagenesis* 42,155-165.
- [6] Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.* 2, 1084-1104.
- [7] Gichner, T., Znidar, I., Szakova, J. (2008). Evaluation of DNA damage and mutagenicity induced by Lead in tobacco plants. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 652,186-190.

Cell damage stage	0	A	B	C	D
Score of damage	0	1	2	3	4

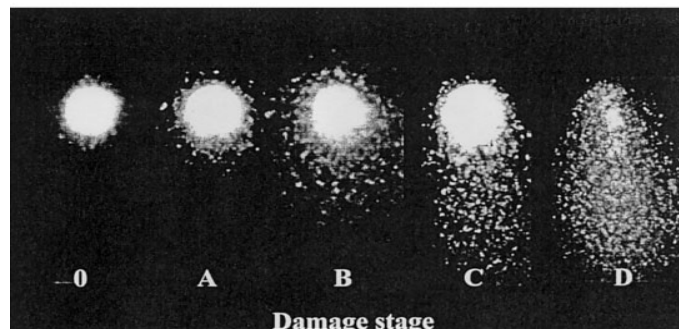


Figura 1. Diferentes estados de los núcleos según un menor o mayor daño del ADN [5].

Tabla 1. Clasificación de núcleos y formación de micronúcleos (MNi)

	Pb (μ M)	Hojas	Raíces	MNi
Control	0	1.01 ± 0.03b	1.39 ± 0.04b	nd
	20	2.99 ± 0.05a	3.02 ± 0.06a	nd
Agustín	0	0.78 ± 0.03b	1.18 ± 0.05b	nd
	20	1.42 ± 0.05a	1.93 ± 0.06a	nd
Mercader	0	0.55 ± 0.03b	0.83 ± 0.04b	nd
	20	0.91 ± 0.04 a	1.28 ± 0.05a	nd

Resultados expresados como la media ± SD (n = 3; > 300 núcleos por tratamiento). Diferentes letras significan diferencias entre tratamientos para p < 0.05. Para MNi se contaron más de 1000 células por tratamiento, (nd = no detectado).

Effect of temperature during on *in vitro* multiplication of *Limonium sinuatum*

Efecto de la temperatura sobre la fase de multiplicación *in vitro* de *Limonium sinuatum*

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. Puerto Lumbreras, Murcia. Spain.

Abstract

Temperature is one of the most important factors in the multiplication phase in the tissue culture of *Limonium sinuatum*. This factor has an effect on the speed of growth and multiplication rate. This paper shows the performance results of a trial of four varieties of statics of different colours, SN9001, SN8946, SN9000, SN9013, grown in Murashige and Skoog basal medium (MS) supplemented with N⁶-benzilademinina (BA) at temperatures of 4 °C , 12 °C and 22 °C. Among the determinations, measurements of plant growth and propagation rate were taken. Production and stem length during the greenhouse cultivation was also measured. The results obtained show that the effects produced by temperature depend on the studied variety, in such a way that for each one of them it is possible to subcultivate it at a specific temperature so that it increases the subcultivation period, lowering the labor requests, and without harming either to the production or to the values needed in the parameters of quality.

Keywords: statics; micropropagation; production.

Resumen

La temperatura es uno de los factores más importantes en la fase de multiplicación en el cultivo *in vitro* de *Limonium sinuatum*. En términos generales este factor afecta, especialmente, a la velocidad de crecimiento y a la tasa de multiplicación. Este trabajo muestra los resultados del comportamiento de un ensayo de cuatro variedades de limonio de distintos colores, SN9001, SN8946, SN9000, SN9013, cultivadas en medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con N⁶-benziladenina (BA) a temperaturas de 4 °C, 12 °C y 22 °C. Entre las determinaciones realizadas, se tomaron medidas del crecimiento de las plantas y de la tasa de propagación. También se midió la producción y la longitud del tallo durante la fase de cultivo en invernadero. Los resultados obtenidos muestran que el efecto de la temperatura depende de la variedad estudiada, de manera que para cada una de ellas es posible subcultivar a una determinada temperatura para aumentar el periodo de subcultivo, bajando los requerimientos de mano de obra, y sin perjudicar a la producción ni a los valores requeridos en los parámetros de calidad estudiados.

Palabras clave: limonio; micropropagación; producción.

* E-mail: jesus.tecnologia@hotmail.com

1. INTRODUCCIÓN

Limonium sinuatum es una especie de la familia de las Plumbagináceas. Esta planta es muy valorada por el mercado tanto para flor seca como para flor en fresco. Esta especie presenta algunos problemas con respecto a la propagación masiva de plantas empleando técnicas convencionales.

La producción de *Limonium* se realiza por semilla o esqueje, de forma que para obtener una planta se necesitan entre 6 y 8 meses, con rendimientos bajos (20-30%) y en muchas ocasiones las plantas no presentan homogeneidad. Como alternativa se suele utilizar la propagación *in vitro* o micropropagación, que se realiza en laboratorio bajo condiciones controladas. La explotación comercial de estas técnicas requiere la optimización de una serie de parámetros. Entre los factores que se deben tener en cuenta se incluyen el método de establecimiento [1,2], la elección del método de cultivo, el ajuste de los medios de cultivo (nutrientes y hormonas) [3], la posible aparición de hiperhidricidad, etc.

La empresa Barberet & Blanc, S.A., situada en Puerto Lumbreras (Murcia), se dedica, entre otras actividades, a la mejora genética y a la obtención de nuevas variedades de *Limonium sinuatum*. Una parte importante de su esquema productivo está basado en el cultivo *in vitro* de la especie, por lo que es necesario depurar la técnica de micropropagación en todas las fases del proceso.

En este trabajo se describe el ensayo realizado con cuatro variedades de limonio de diferentes colores, SN9001 (rosa), SN8946 (violeta), SN9000 (amarillo) y SN9013 (blanco), con el objetivo de conocer el efecto que tiene la temperatura sobre la fase de multiplicación y la etapa posterior de cultivo en invernadero. Esto es importante, ya que uno de los problemas que se plantean en la micropropagación de la especie es el cómo alargar entre subcultivos, de forma que se pueda controlar mejor la producción con un ahorro en los costes de mano de obra. El fin último de este ensayo es conseguir, durante la etapa de cultivo *in vitro* de limonio, un crecimiento y una producción total de plantas similares a las obtenidos en las condiciones de control (a mayor temperatura), pero aumentando el tiempo entre subcultivos, y obteniendo valores altos en los parámetros de producción y de calidad durante el cultivo en invernadero.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

Para realizar este ensayo se utilizaron plantas establecidas en cultivo *in vitro* de *Limonium sinuatum* de las variedades SN9001, SN8946, SN9000, SN9013 y que se encontraban en la fase de multiplicación.

En esta fase de multiplicación se utilizó un medio de cultivo con la concentración de macro y micronutrientes descrita por Murashige y Skoog (1962) [4] y suplementado con un 4 % (p/v) de sacarosa, y N⁶-benziladenina (BA) a una concentración de 0,2 mg/L. Posteriormente, el pH de los medios se ajustó a 5,8 y se añadió agar a una concentración del 0,9% (p/v). El medio se distribuyó en tubos de ensayos y éstos se autoclavaron a 104 KPa y a 121 °C durante 20 min. Todos los cultivos se mantuvieron a 22 °C y un fotoperiodo de 16 h.

2.2 Tratamientos y análisis estadístico

Para estudiar el efecto de la temperatura se establecieron tres tratamientos para cada una de las variedades. En el tratamiento 1 (T-1) las plantas se mantuvieron a 4 °C durante tres meses, el tratamiento 2 (T-2) las plantas estuvieron a 12 °C durante tres meses, y el tratamiento 3 (T-3) las plantas se subcultivaron a 22 °C por un periodo de un mes (control). Se cultivaron 20 plantas por variedad y tratamiento con tres repeticiones. En la fase de multiplicación se tomaron medidas

del crecimiento a los 40 y 90 días, para T-1 y T-2, y a los 35 días para T-3; y de la tasa de propagación al finalizar el subcultivo. Durante la fase de cultivo en invernadero se tomaron medidas sobre la producción (tallos/planta) y, longitud del tallo (cm), determinando así la calidad agronómica y comercial. Todos los datos recogidos 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 Crecimiento y tasa de multiplicación

El crecimiento a los 40 días para todas las variedades no presentó diferencias entre T-1 y T-2 (Tabla 1). Para SN9001, SN8946 y SN9013 el crecimiento a 4 °C fue menor que para las otras temperaturas, sin embargo en SN9000 no se observaron diferencias significativas entre los crecimientos al final del periodo de subcultivo. Con respecto a la tasa de multiplicación no se observaron diferencias significativas entre tratamientos en ninguna de las variedades.

3.2 Producción y parámetros de calidad

En la variedad SN9001 la producción para T-1 y T-2 estuvo por debajo de lo exigido (>8 tallos/planta). Para SN8946 solo el tratamiento de 4 °C presentó una producción baja, estando los otros tratamientos por encima. Para SN9000 y SN9013, las producciones estuvieron por encima de lo exigido. En cuanto a la longitud del tallo, se puede apreciar en la Figura 2 que el T-3 en SN9001 presentó diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos, aunque todas estuvieron por encima de 60 cm. Para las otras variedades no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, situándose SN8946 y SN9000 en todas las temperaturas cerca de lo exigido, SN9013 presentó, incluso, tallos más largos de lo requerido.

4. CONCLUSIONES

En la variedad SN9001 se aprecia un crecimiento parecido a 12 °C y 22 °C, y superior a 4 °C, siendo la tasa de multiplicación similar en todos los tratamientos. Sin embargo, la producción para los tratamientos 1 y 2 está por debajo de lo exigido. En consecuencia, se considera continuar con el subcultivo a la temperatura de 22 °C para esta variedad.

Para la variedad de color violeta SN8946, el crecimiento del tratamiento 1 es menor. También se observa para ese tratamiento una menor producción. Además, como en los tratamientos 2 y 3 los datos son similares y acorde a los exigidos se podría pasar a realizar los subcultivos a una temperatura de 12 °C

En la variedad SN9000, de color amarillo, no se ven diferencias en cuanto al crecimiento y a la tasa de multiplicación entre tratamientos. Sin embargo, la producción para el tratamiento de 4 °C es menor. Por este motivo, y debido a que los parámetros de calidad para los otros tratamientos se mantienen de acuerdo a lo exigido, esta variedad se puede pasar a subcultivar a 12 °C.

Para la variedad SN9013, el crecimiento y tasa de multiplicación son mayores en los tratamientos de 12 °C y 22 °C, siendo aceptables los datos de tratamiento de 4 °C. Como no se aprecian diferencias entre tratamientos respecto a los parámetros de calidad, se considera que se podría subcultivar a 4 °C o a 12 °C.

5. AGRADECIMIENTOS

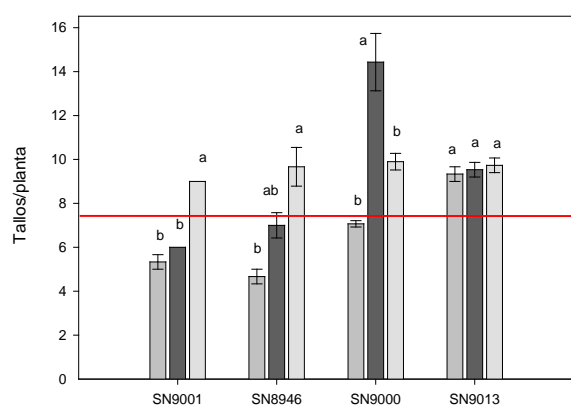
Este trabajo está siendo apoyado y financiado por la empresa Barberet & Blanc, S.A. Algunos de los ensayos han sido llevados a cabo en las instalaciones del Instituto de Biotecnología Vegetal de la UPCT.

6. REFERENCIAS

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Xiao, Y. and Kozai, T. (2006). In vitro multiplication of statice plantlets using sugar-free media. *Sci. Hortic.* 109: 71-77.
- [4] Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

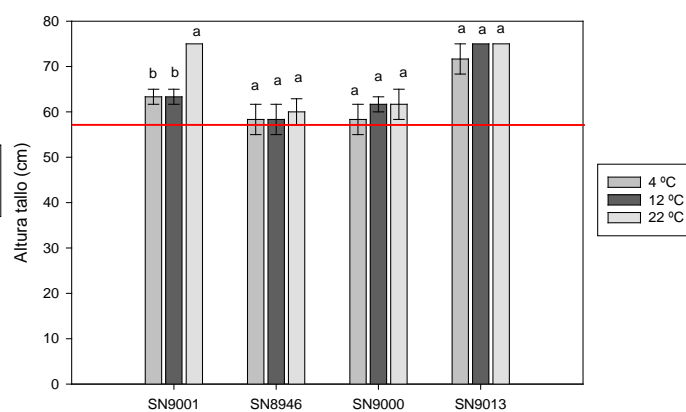
Tabla 1. Crecimiento y tasa de multiplicación de las variedades de limonio estudiadas.

Variedades	Temperaturas	Crecimiento 40 días (cm)	Crecimiento 90 o *35 días (cm)	Tasa de multiplicación (Nº brotes/planta)
SN9001	4°C	2.84 ± 0.24a	3.25 ± 0.22a	1.35 ± 0.13a
	12°C	3.61 ± 0.31a	5.94 ± 0.62b	1.47 ± 0.15a
	22°C	---	5.72 ± 0.43b*	1.61 ± 0.23a
SN8946	4°C	3.26 ± 0.38a	3.86 ± 0.41a	2.17 ± 0.48a
	12°C	4.41 ± 0.21a	7.39 ± 0.99b	1.94 ± 0.27a
	22°C	---	6.45 ± 0.18b*	2.17 ± 0.17a
SN9000	4°C	3.25 ± 0.31a	3.67 ± 0.33a	1.94 ± 0.31a
	12°C	3.27 ± 0.21a	4.68 ± 0.41a	2.29 ± 0.15a
	22°C	---	4.55 ± 0.07a*	2.07 ± 0.17a
SN9013	4°C	4.57 ± 0.18a	5.28 ± 0.22a	1.89 ± 0.04a
	12°C	5.81 ± 0.04b	8.87 ± 0.47b	2.17 ± 0.56a
	22°C	---	7.72 ± 0.27b	2.07 ± 0.11a



La línea indica el mínimo de producción exigido (8 tallos/planta)

Figura 1. Efecto de la temperatura durante la micropropagación sobre la producción de las variedades en plantas crecidas en condiciones de invernadero.



La línea indica la longitud mínima para la calidad extra (60 cm)

Figura 2. Efecto de la temperatura durante la micropropagación sobre la longitud del tallo de plantas crecidas en condiciones de invernadero.



ORAL SESSION III

Plant Production
Technology and
Engineering

Dynamics of phosphorus in wetlands with different degree of eutrophication: experimental results in mesocosms

Dinámica del fósforo en humedales con diferente grado de eutrofización: resultados experimentales en mesocosmos

M.C. Tercero^{*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 Ecological Science. Faculty of Earth and Life Sciences. Vrije Universiteit. De Booleaan 1085, 1081 HV Amsterdam, The Netherlands.

Abstract

The objective was to determine the response of wetlands against high concentrations of P, assessing their retention capacity. This was tested in mesocosms that were flooded with waters of different eutrophication levels (low level -BN: 6.1 mg L⁻¹ PO₄³⁻; high level -AN: 61 mg L⁻¹ PO₄³⁻) for 1 year. Treatments: BN + not plant; AN + not plant; BN + *Phragmites australis*; AN + *Phragmites*. The concentrations of PO₄³⁻ were measured in soil solution and drainage samples and the different P fractions retained by the soil were determined. After 24 h of flooding the concentrations of PO₄³⁻ in the soil solution were decreased ~90% compared to the flooding water, regardless the eutrophication level and the presence of *Phragmites*. The soil acted as a sink of P that was mainly fixated by the Ca/Mg compounds and the metal oxides.

Keywords: P sequential extraction; *Phragmites australis*; Mar Menor; green filters.

Resumen

El objetivo fue conocer la respuesta de humedales frente a elevadas concentraciones de P, valorando su capacidad de retención. Se ensayó en mesocosmos que se inundaron con aguas de diferente nivel de eutrofización (bajo nivel -BN: 6,1 mg L⁻¹ PO₄³⁻; alto nivel -AN: 61 mg L⁻¹ PO₄³⁻) durante 1 año. Tratamientos: BN + no planta; AN + no planta; BN+ *Phragmites australis*; AN + *Phragmites*. Se midió PO₄³⁻ en el agua de poro y drenajes y las fracciones de P retenido en el suelo. A las 24 h de haber inundado ya se había producido una reducción del ~90% del PO₄³⁻ del agua de inundación, independientemente de la carga de nutrientes y la presencia de *Phragmites*. El suelo actuó como sumidero de P, que quedó retenido sobre todo en los compuestos de Ca/Mg y óxidos metálicos.

Palabras clave: extracción secuencial de P; *Phragmites australis*; Mar Menor; filtros verdes.

* E-mail: carmen.tercero@upct.es

1. INTRODUCCIÓN

Numerosos trabajos han demostrado que el Mar Menor y los humedales de su entorno reciben aguas con altas concentraciones de P y otros nutrientes, cuyo origen se ha atribuido a lixiviados y efluentes procedentes de actividades agrícolas y urbanas [1]. Se ha demostrado también que los humedales costeros de la zona contribuyen a depurar éstas aguas cuando discurren a través de ellos [2]. Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) valorar en qué medida el sistema suelo-planta de estos humedales es capaz de depurar aguas con elevadas concentraciones de P cuando son sometidos a condiciones de inundación-desección, 2) establecer si la capacidad de depuración está influida por la presencia de *Phragmites australis* y, 3) conocer qué componentes del suelo son los principales responsables de la fijación del P.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Experimento

Se recogieron muestras de suelo, arena y *Phragmites* de la Marina del Carmolí, el mayor saladar costero del Mar Menor. El material recogido se introdujo en 12 mesocosmos (cajones de metacrilato de 0,5x0,5x1 m³) creando dos horizontes edáficos: superficial (suelo, 25 cm de espesor) y subsuperficial (arena, 15 cm espesor). Los mesocosmos se equiparon según [3]. Los tratamientos ensayados fueron: 1) bajo nivel de nutrientes + no planta (BNNP), 2) bajo nivel de nutrientes + *Phragmites* (BNP), 3) alto nivel de nutrientes + no planta (ANNP), y 4) alto nivel de nutrientes + *Phragmites* (ANP) (n=3). El régimen hídrico consistió en inundar (~5 cm sobre la superficie del suelo) los mesocosmos durante 3-4 semanas (fases de inundación) y en drenarlos durante las siguientes 3-4 semanas (fases de desecación). Los ciclos de inundación-desección se repitieron 6 veces durante 44 semanas. Para los tratamientos con BN se preparó un agua con 20 mg L⁻¹ de NO₃⁻, 0,5 mg L⁻¹ de NH₄⁺, 6,1 mg L⁻¹ de PO₄³⁻ y 10 mg L⁻¹ de carbono orgánico disuelto (COD). Los tratamientos AN presentaban una concentración 10 veces mayor de NO₃⁻, NH₄⁺, PO₄³⁻ y COD que el agua BN. A lo largo del experimento se recogieron muestras del agua de poro. Cada mesocosmos tenía un grifo para la recogida de los drenajes al final de cada fase de inundación. En todas las muestras de agua recogidas se analizaron las concentraciones de PO₄³⁻ [4]. Al inicio y final del experimento se tomaron muestras de suelo para el análisis de las concentraciones de P ligadas a diferentes componentes edáficos [5]. El P total se calculó por suma de las diferentes fracciones obtenidas.

2.2 Análisis estadístico de los datos

Se realizó con SPSS 17.0. Para cada horizonte, y con el fin de comparar la evolución de las concentraciones de PO₄³⁻ a lo largo del tiempo y entre los diferentes tratamientos ensayados, se llevó a cabo un ANOVA de medidas repetidas. Las concentraciones de P en el suelo al inicio y al final del experimento se compararon con un T-test. En todos los casos el nivel de significación fue p=0,005.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tanto en los tratamientos BN como AN las concentraciones de PO₄³⁻ en el agua de poro disminuyeron significativamente durante los ciclos de inundación-desección, en superficie y en profundidad, independientemente de la presencia de *Phragmites* (Fig. 1). Los horizontes superficiales presentaron concentraciones de PO₄³⁻ más elevadas que los subsuperficiales en el agua de poro (Fig. 1), lo que indica que la mayor parte del P no alcanzó los horizontes inferiores. En superficie, las concentraciones de PO₄³⁻ tuvieron una bajada muy brusca en las primeras horas de inundación (disminución del 94-97% en las primeras 24 h). Los drenajes reflejaron la retirada

de PO_4^{3-} del medio al presentar concentraciones ~97-99% más bajas que el agua de inundación (datos no mostrados).

El P total fue más alto en los horizontes superficiales y aumentó significativamente en los tratamientos con alto nivel de nutrientes (Fig. 2). En dichos horizontes superficiales la fracción mayoritaria de P fueron los compuestos de Ca/Mg (~30 a 45%) y el P orgánico (~40 a 50%), mientras que en los subsuperficiales ~90% del P fue orgánico, seguido de la fracción ligada a compuestos metálicos de Fe/Mn/Al (~5%). Para todos los tratamientos ensayados hubo un incremento significativo del P lábil (P soluble y ligado al complejo de cambio) entre el inicio y el final del experimento.

4. CONCLUSIONES

Aunque la adición de P con el agua de inundación se reflejó en un aumento del P lábil del suelo, todos los tratamientos ensayados fueron efectivos en la retención del PO_4^{3-} , independientemente de la presencia de *Phragmites* y de la carga de nutrientes del agua de inundación. Por tanto, el suelo actuó como un sumidero de P, que quedó retenido en las fracciones más reactivas (óxidos metálicos de Fe/Mn/Al y los compuestos de Ca/Mg). Si *Phragmites* contribuyó a la retirada de P del medio, su papel debió de ser irrelevante.

5. AGRADECIMIENTOS

Proyecto financiado por el MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACIÓN (CGL2010-20214.)

6. REFERENCIAS

[1] Álvarez-Rogel, J., Jiménez-Cárceles, F. J., Egea-Nicolás, C. (2006). Phosphorus and nitrogen content in the water of a coastal wetland in the Mar Menor lagoon (SE Spain): relationships with effluents from urban and agricultural areas. *Water Air Soil Poll.* 173, 21-38.

[2] Jiménez-Cárceles, F. J., Álvarez-Rogel, J. (2008). Phosphorus fractionation and distribution in salt marsh soils affected by mine wastes and eutrophicated water: a case in SE Spain. *Geoderma* 144, 299-309.

[3] Tercero, M. C., Álvarez-Rogel, J., González-Alcaraz, M.N. (2014). Ciclos biogeoquímicos en humedales con diferente grado de eutrofización y su relación con factores de cambio climático: resultados experimentales en mesocosmos. En: III Workshop en Investigación Agroalimentaria: -WiA3.14-. Cartagena: Universidad Politécnica de Cartagena, Servicio de Documentación, 2014. 275 p.

[4] Murphy, J., Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chem.* 42, 1011-1026.

[5] Paludan, C., Morris, J. T. (1999). Distribution and speciation of phosphorus along a salinity gradient in intertidal marsh sediments. *Biogeochem.* 45, 197-221.

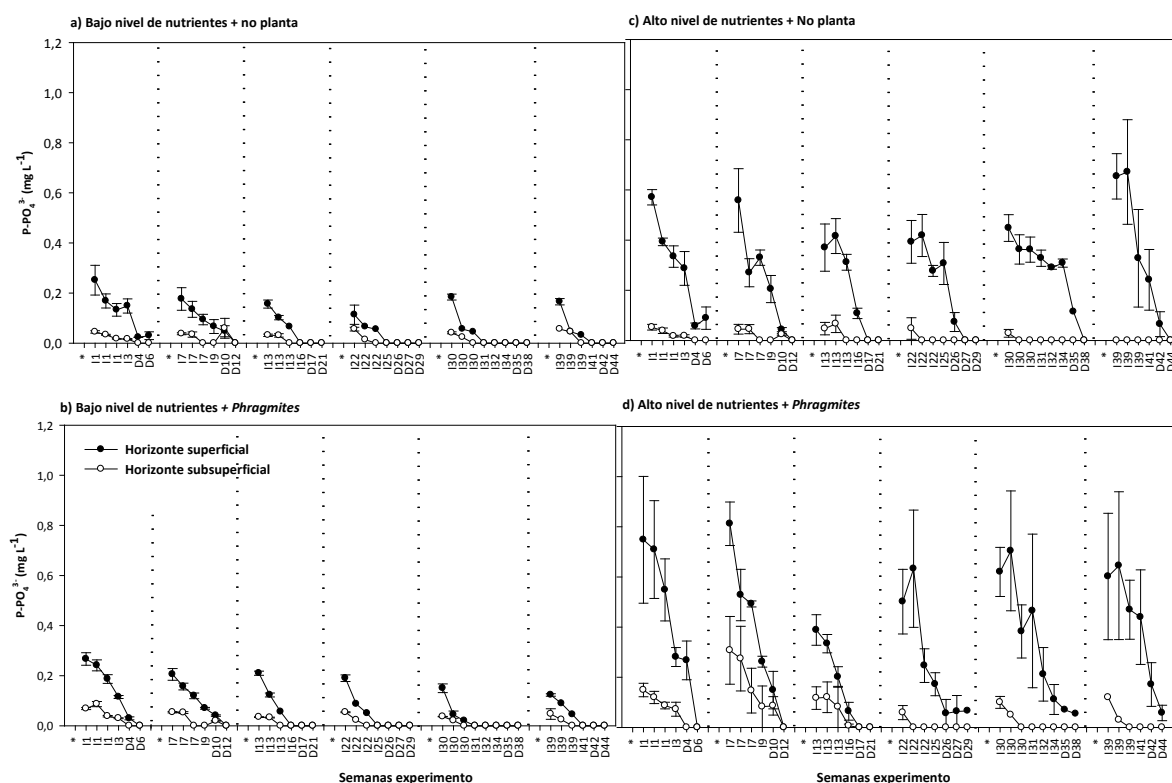


Figura 1. Evolución de la concentración de $P-PO_4^{3-}$ en el agua de poro a lo largo del experimento en los horizontes de superficie y profundidad ($n=3$). Los valores son la media \pm error estándar. I designa las fases de inundación y D las de desecación. El número que le sigue a cada letra se refiere a la semana del experimento. Los asteriscos indican la adición de agua eutrofizada.

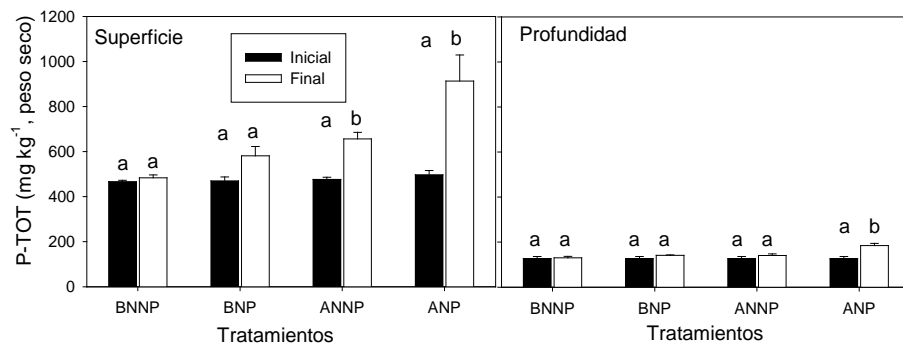


Figura 2. Concentraciones totales de P en el suelo al inicio y al final del experimento en los horizontes de superficie y profundidad ($n=3$). Los valores son las medias \pm error estándar. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas según el t-test, a $p < 0,05$. BMNP (bajo nivel de nutrientes + no planta). BNP (bajo nivel de nutrientes + *Phragmites*). ANNP (alto nivel de nutrientes + no planta). ANP (alto nivel de nutrientes + *Phragmites*).

Selection of a resistance population of *Tuta absoluta* to emamectin benzoate

Selección de una población de *Tuta absoluta* resistente a emamectina benzoato

M.R. Martínez-Aguirre*, L. García-Vidal, P. Bielza

Protección de Cultivos. Departamento de Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena. 30203 Cartagena.

Abstract

Since tomato moth, *Tuta absoluta*, appeared in Spain it became the key pest of tomato crops. Due to insufficient authorized insecticides for its control, development of resistance is nearly inevitable. In this work a population of tuta resistant to emamectin benzoate has been selected through continuous treatments and continuously feeding the larvae with plants treated with a sublethal dose. It was obtained a susceptibility factor close to 47 after 18 rounds of selection. This decrease of the susceptibility is due to selection pressure and in addition by physiological adaptation by insects when exposed to low doses of insecticide.

Keywords: sublethal; insecticide; moth; tomato; susceptibility.

Resumen

Desde que apareció en España la polilla del tomate, *Tuta absoluta*, se ha convertido en la plaga clave del cultivo de tomate. Debido a la insuficiencia de insecticidas autorizados para su control, la creación de resistencias es inevitable. En este trabajo se ha seleccionado una población de tuta a emamectina benzoato mediante tratamientos de selección y alimentando las larvas continuamente con plantas tratadas a una dosis subletal. Tras 18 ciclos de selección se ha obtenido un factor de susceptibilidad cercano a 47. Esta disminución de la susceptibilidad es debida a la presión de selección realizada y además, está causada por la adaptación fisiológica que realizan los insectos cuando están expuestos a bajas dosis de insecticida.

Palabras clave: subletal; insecticida; polilla; tomate; susceptibilidad.

1. INTRODUCCIÓN

Tuta absoluta, comúnmente conocida como la polilla del tomate, se cree que es nativa de Sudamérica y fue descrita originalmente en Perú [1]. En España se detectó por primera vez en invernaderos de tomate en el invierno de 2006 - 2007 en Torreblanca (Castellón). Desde que se detectó, tuta ha causado considerables daños en hojas y frutos del cultivo de tomate, comportándose como una plaga muy voraz y alcanzando niveles poblacionales elevados en el cultivo del tomate [2].

* E-mail: charo_martinez_aguirre@hotmail.com

El insecticida estudiado es emamectina benzoato, es una avermectina de segunda generación con actividad frente a lepidópteros [3]. Actúa como un activador del canal de cloro, tiene acción sobre el sistema nervioso y muscular. Poco después de la exposición a dicho producto las larvas dejan de comer, se paralizan y mueren [4]. Este insecticida se encuentra dentro del grupo 6 de la clasificación del IRAC (Comité de acción contra la resistencia a insecticidas) [5]. Su nombre comercial es Affirm® y pertenece a Syngenta.

Debido a las escasas materias activas autorizadas para esta plaga y la dificultad de su control, es importante estudiar la posible creación de resistencias debido a la repetición en los tratamientos insecticidas con el mismo modo de acción.

El objetivo de este trabajo consiste en crear una población de tuta resistente a emamectina alimentándola con planta tratada y realizando continuas selecciones.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se parte de la población sensible de referencia “Águilas” y el material vegetal utilizado es *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Bobcat.

2.1 Cría de la población

Desde el inicio del estudio la población se ha alimentado con plantas de tomate tratadas a una dosis subletal de emamectina. Esta dosis corresponde a la DL_{10} (dosis a la cual se muere el 10% de la población). Dicha dosis se va aumentando a lo largo del estudio conforme la población va creando resistencia. El tratamiento de las plantas se realiza mediante pulverización hasta punto de goteo.

2.2 Bioensayo de selección

La selección comenzó en marzo de 2012 de la siguiente manera (selección precedente): una vez establecida la población se introducía planta sin tratar en la jaula a demanda de la necesidad de alimento y se iba tratando toda la jaula (plantas, larvas y adultos) mediante pulverización hasta punto de goteo.

En diciembre de 2013, tras 5 ciclos de selección, se cambió la metodología. La selección se lleva a cabo en larvas de segundo estadio (L2). Para conseguir esto se lleva a cabo la sincronización de la oviposición (puesta). Una vez se tienen las L2 se sumergen todas las hojas con las larvas en su interior, previo conteo del número de larvas, en la concentración preparada. Después las hojas son introducidas en unos envases transparentes con hidratación para la hoja. Transcurridos 3-4 días se lee el bioensayo y las larvas vivas se ponen sobre planta tratada en una jaula nueva y se procede a su cría, pasando así a la siguiente “selección (S)”. La dosis a la cual se selecciona irá en aumento en función de la respuesta de la población frente al insecticida.

2.3 Bioensayo de susceptibilidad

En este tipo de bioensayos también se comienza con la sincronización de la oviposición. Cuando se tienen las L2 se tratan 3 hojas de tomate de planta limpia por concentración y se ponen 10 L2 (extraídas de la puesta) sobre cada hoja, obteniendo un total de 3 repeticiones de 10 larvas por concentración. Pasadas 72 horas se procede a la lectura del bioensayo, distinguiendo entre larvas vivas, muertas y moribundas (se consideran muertas a la hora de trabajar con los datos). Los datos se analizan mediante método probit con ayuda del programa Polo Plus.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se tienen datos del efecto de los tratamientos sobre la población de las primeras selecciones realizadas (Tabla 1). A partir de diciembre de 2013 se cambia la metodología y se

comienza a tener datos de la mortalidad en cada selección (Tabla 3). Se comienza en la S7 tratando a 0,3 ppm hasta la S11 y la mortalidad al principio es bastante alta (90%), disminuyendo en la S8 (41%) y volviendo a subir en la S9 y S10 (62-68%). A partir de la S11 se comienza a seleccionar a 0,4 ppm hasta la S18. La mortalidad en estas 7 selecciones varía entre un 68 y un 86%, teniendo que bajar la concentración de selección en ciertos casos para asegurarse el mantenimiento de la población. Ya en la S18 se aumenta la dosis a 1 ppm presentando un porcentaje de mortalidad del 67,60%. Debido a la disminución de la mortalidad se consideró aumentar la concentración de selección. A 3 ppm la mortalidad fue de un 78,63%. Estos datos son alentadores en el estado de la resistencia de la población. En la actualidad se está seleccionando a 3 ppm en la S19.

En la Tabla 2 se muestran los resultados de los bioensayos de susceptibilidad que se han ido realizando a lo largo de la selección. Estos datos indican que con el paso de las selecciones, la población va creando "resistencia", cada vez es menos susceptible pasando de una DL_{50} de la población inicial de 0,0129 ppm a una DL_{50} de 0,6030 ppm en la S17. Datos similares son observados en *Spodoptera litura* en las poblaciones sensibles, disminuyendo la sensibilidad a media que se va seleccionado [6]. En la S17 la población es casi 47 veces más resistente que al inicio del estudio. Con la ayuda de estos bioensayos se han ido determinando las dosis a las cuales se trata la planta de cría teniendo en cuenta principalmente la DL_{10} (última columna de la Tabla 3).

Además del efecto de la selección, la disminución de la susceptibilidad puede verse favorecida por la alimentación. Esto es así porque cuando los insectos están expuestos a dosis bajas de insecticida, los insectos pueden desarrollar resistencia adaptándose fisiológicamente [7]. Ese efecto se ha estudiado para *Trialeurodes vaporariorum* y *Bemisia tabaci* biotipo B, donde se han expuesto a la DL_{25} de diferentes insecticidas durante 7 generaciones. Los datos más destacados para *B. tabaci* muestran un ratio de resistencia para nitenpiram, imidacloprid y acetamiprid de 6, 3,1 y 5 respectivamente. En *T. vaporariorum* cabe destacar el efecto del nitenpiram e imidacloprid con ratios del 3,7 y 2,5 respectivamente [7].

4. CONCLUSIONES

La población muestra una disminución de la susceptibilidad a emamectina benzoato. Esto está causado por un efecto conjunto de la presión de selección realizada, junto con la resistencia desarrollada debido a una adaptación funcional que lleva a cabo el insecto, al estar alimentándose continuamente de planta tratada a una dosis subletal.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradecer la financiación del Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2011-25164) y los fondos europeos FEDER. Y además la financiación parcial por IRAC España.

6. REFERENCIAS

- [1] Desneux, N., Wajnberg, E., AG, WyckhuysKris, Burgio, G., Arpia, S., Narváez-Vasques, C.A., González-Cabrera, J., Catalán Ruescas, D., Tabone, E., Frandon, J., Pizzol, J., Poncet, C., Cabello, T., Urbaneja, A. (2010). Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *J. Pest Sci.* 83, 197 – 215.
- [2] García-Marí, F., Vercher, R. (2010). Descripción, origen y expansión de *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Phytoma España* 127, 16–20.
- [3] Teran-Vargas, A.P., Garza-Urbina, E., Blanco-Montero, C.A., Perez-Camona, G., Pellegaud-Rabago, J.M. (1997). Efficacy of new insecticides to control beet armyworm in north Eastern Mexico. In: Proceedings of the Beltwide Cotton Conference of the National Cotton Council, New Orleans, Louisiana, 1030-1031.

[4] Crafton-Cardwell, E.E., Godfrey, L.D., Chaney, W.E., Bentley, W.J., (2005). Various novel insecticides are less toxic to humans, more specific to key pests. *Calif. Agric.* 59, 29-34.

[5] www.irac-online.org. Insecticide Resistance Action Committee. Marzo 2016.

[6] Sarfraz, A.S., Sayyed, A.H., Saleem, M.A. (2010). Cross-resistance, mode of inheritance and stability of resistance to emamectin in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag. Sci.* 66, 839-846.

[7] Liang, P., Tian, Y., Biondi, A. (2012). Short-term and transgenerational effects of the neonicotinoid nitenpyram on susceptibility to insecticides in two whitefly species. *Ecotoxicology* 21, 1889-1898.

Tabla 1. Primeras selecciones realizadas.

Selección precedente	ppm	Fecha
S0	0,02	mar-12
S1	0,1	abr-12
S2	0,15-0,2	sept-nov 12
S3	0,05-0,1	nov-12
S4	0,05-0,1	feb-mar 12
S5	0,1-0,3	may-13
S6	0,5	jun-ago 13

Tabla 2. Resultados de los bioensayos de susceptibilidad realizados en las distintas selecciones

Fecha	Selección	DL50	DL10	DL90
abr-11	Águilas	0,0129	0,0051	0,0328
sep-12	S6	0,0370	0,0050	0,2850
jun-14	S8	0,1990	0,0420	0,9370
abr-15	S12	0,1780	0,0310	1,0090
feb-16	S17	0,6030	0,1760	2,0060

Tabla 3. Concentración a la que se tratan las plantas de cría, datos de los bioensayos de selección y sus resultados.

Selección	ppm	Larvas totales	Larvas vivas	Larvas muertas	Mortalidad %	Plantas de cría (ppm)
S7	0,30	672	67	606	90,06	0,005
S8	0,30	298	59	239	41,36	0,005
S8	0,30	512	62	450	62,62	0,01
S10	0,30	911	344	567	68,48	0,01
S11	0,40	1.066	143	923	86,15	0,01
S12	0,40	732	282	450	78,84	0,01
S13	0,40	927	299	628	68,50	0,03
S14	0,40	901	294	607	58,75	0,03
S15	0,40	1.073	188	885	84,44	0,03
S16	0,40	1.400	478	922	68,43	0,03
S17	0,40	923	302	621	71,95	0,03
S18	1,3	943	347	596	71,38	0,03

Does reclaimed water influence nitrogen and water use efficiency and the structural constituents of grapefruit trees?

¿Afecta el riego con agua regenerada a la eficiencia del uso del agua y nitrógeno y a los constituyentes estructurales de pomelo?

C. Romero-Trigueros*, P.A. Nortes, J.J. Alarcón, E. Nicolás

Departamento de Riego. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC). Campus Universitario de Espinardo, 30100. Murcia. Spain

Abstract

Effects of the application of reclaimed water (RW), combined with strategies of deficit irrigation (RDI) on physiological parameters and development of grapefruit plant were evaluated, highlighting the potential changes in water (WUE) and nitrogen (NUE) use efficiency and performing a characterization of structural elements and constituents at leaf level. RW improved the WUE and, conversely, decreased the NUE, the chlorophyll content and levels of gas exchange. In addition, the application of RW resulted in a potential accumulation of salts at the level foliar.

Keywords: chlorophyll; gas exchange; phytotoxic; salinity; specific leaf weight.

Resumen

Se evaluaron los efectos que tiene la aplicación de agua regenerada (AR), en combinación con estrategias de riego deficitario controlado (RDC), sobre los parámetros fisiológicos y de desarrollo de la planta de pomelo, destacando los posibles cambios en la eficiencia del uso del agua (EUA) y del nitrógeno (EUN) y realizando una caracterización de los elementos estructurales y constituyentes a nivel foliar. Se observó una mejora de la EUA en los tratamientos regados con AR y, por el contrario, una disminución de la EUN, del contenido en clorofila, de los niveles de intercambio gaseoso y, además, dio lugar a una potencial acumulación de sales a nivel foliar.

Palabras clave: clorofila; fitotóxico; intercambio gaseoso; peso específico foliar; salinidad.

1. INTRODUCCIÓN

La problemática actual de escasez de recursos hídricos disponibles para la agricultura obliga a buscar fuentes de agua alternativas para nuestros sistemas de riego. En este sentido, las aguas regeneradas (AR) constituyen un recurso no convencional de agua. Entre las ventajas del uso agrícola de las AR está la reducción de la contaminación del medio ambiente, ya que el vertido directo de estas aguas al cauce natural exigiría un tratamiento más costoso para reducir al mínimo aportes como macronutrientes (N,P,K) que, sin embargo, pueden resultar positivas para los cultivos al utilizarse como abono [4]. Sin embargo, la utilización de AR puede conllevar riesgos para la agricultura ya que suelen tener una concentración de sales superior a la que se encuentra en los recursos hídricos naturales, pudiendo afectar a las propiedades físico-químicas del suelo.

* E-mail: cromero@cebas.csic.es

Además, pueden aparecer problemas fitotóxicos de salinidad cuando la conductividad eléctrica del agua de riego es mayor de 1.5 dS/m. Esta limitación es especialmente importante para cítricos, ya que es una especie sensible a la salinidad del agua de riego [7]. Así, niveles elevados de fitotóxicos en cítricos pueden causar una reducción del crecimiento vegetativo y un descenso de los niveles de intercambio gaseoso [2]. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos que tiene la aplicación de AR, en combinación con estrategias de riego deficitario controlado (RDC), sobre los parámetros fisiológicos y desarrollo de la planta de pomelo, prestando especial importancia a dos aspectos: a) evaluar si existen cambios evidentes en la eficiencia del uso del agua (EUA) y del nitrógeno (EUN) a nivel de planta y b) realizar una caracterización de los elementos estructurales y constituyentes a nivel foliar en función de los recursos hídricos utilizados (agua de trasvase Tajo-Segura y AR). Además, se evaluaron también los efectos sobre el medio ambiente (acumulación de sales y disponibilidad de nutrientes) analizando, desde un punto de vista integral, su sostenibilidad a medio-largo plazo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se realizó durante el año 2012 en una finca comercial ubicada al noreste de la Región de Murcia (38°07'N, 1°13'W). Se trabajó en pomelo (*Citrus paradisi* L. cv. 'Star Ruby') sobre patrón *Citrus Macrophylla* de 8 años de edad a marco de 6 x 4 m. La parcela experimental tiene una superficie aproximada de 1 ha. Se emplearon dos fuentes de agua de riego: la primera procedente del trasvase Tajo-Segura (AT), de buena calidad agronómica (CE~1 dS/m) y la segunda procedente de la Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) de Molina de Segura Norte (AR), caracterizada por generar un efluente de salinidad agronómica (CE~3 dS/m). Se establecieron dos tratamientos de riego para cada calidad de agua; un tratamiento Control que se regó a fin de satisfacer los requerimientos hídricos del cultivo (100% ETc) y otro de riego deficitario controlado (RDC), regado con idéntica dotación que el Control durante todo el año excepto durante la segunda fase de crecimiento rápido del fruto, en la que se regó al 50% de la ETc, al objeto de conseguir un déficit hídrico moderado durante la fase no crítica. Los cuatro tratamientos resultantes, de aquí en adelante serán citados como: T0 (Control AT), T1 (RDC AT), T2 (Control AR) y T3 (RDC AR). Los parámetros de intercambio gaseoso (fotosíntesis neta, A, y la conductancia estomática, g_s) se midieron con un equipo portátil de fotosíntesis (LI-6400 Li-Cor, Lincoln, NE, EE.UU). Además, se tomaron muestras foliares para determinar el peso fresco, el área foliar (LI-3100 Leaf Area Meter, NE, EEUU), el estado nutricional de la planta en los diferentes estados fenológicos y su contenido en N en el Servicio de Ionómicas del CEBAS-CSIC (Flash EA 112 Series, England and Leco Truspec, Sant Joseph, USA), así como el peso seco para la determinación del nitrógeno en base al área foliar y el peso específico foliar (PEF). Además, se analizó el contenido de clorofila total, a y b mediante el método de Inskeep and Bloom (1985).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Eficiencia en el uso del agua (EUA) y del nitrógeno (EUN).

La eficiencia intrínseca de uso del agua, $EUA \sim A/g_s$, representa la máxima eficiencia con la que la fotosíntesis puede operar bajo unas condiciones medioambientales determinadas. Las variaciones en A y g_s implicaron un incremento de la EUA en los tratamientos regados con AR (datos no mostrados). En concreto, los valores son sensiblemente más altos para a) T3 durante la fase de brotación y floración y para b) T2 durante la fase de crecimiento del fruto y, por tanto, durante la aplicación del RDC (días comprendidos entre 204 y 255) debido a una reducción notable de la g_s en el periodo de RDC (datos no mostrados). En este sentido, la EUA puede ser útil como un indicador de la tolerancia a la salinidad [8]. Respecto a la eficiencia del uso del nitrógeno, $EUN \sim A/N_a$, al avanzar el ciclo anual se hizo más notable la diferencia entre tratamientos,

alcanzando el T0 los niveles más altos al final de la fase de crecimiento del fruto (datos no mostrados). A partir de este momento, la EUN de ambos tratamientos comenzó sensiblemente a disminuir. Tras obtener el valor medio anual, el T2 tiene una eficiencia inferior al resto de los tres tratamientos debido, probablemente, a la disminución de A, y al aumento del nitrógeno en base al área foliar, N_a .

3.2 Caracterización de la estructura y constituyentes a nivel foliar.

Los cambios en la ontogenia foliar son importantes en la optimización del proceso fotosintético [3]. Por ello se analizó la evolución estacional del peso específico foliar, PEF, que alcanza su valor más alto en marzo para los distintos tratamientos, disminuyendo progresivamente hasta julio, y la evolución del N_a que, por el contrario, adquiere su valor más bajo durante la floración y tiende a aumentar hasta final de año [1], Figura 1. Esto nos indica que las hojas juegan un papel importante como órgano de reserva de asimilados. Las fluctuaciones observadas a lo largo del ciclo pueden deberse a la alternancia de periodos de removilización de asimilados y periodos de almacenaje de los mismos. No hay diferencias significativas tratamientos, no obstante, T2 y T3 tienen un promedio anual de PEF más bajo y para el N_a , un valor más elevado respecto a los árboles regados con AT. Respecto a los elementos fitotóxicos, los tratamientos de riego T2 y T3 presentan concentraciones de Cl, B y Na más elevadas que los árboles regados con AT –el B supera el umbral fitotóxico establecido-, Tabla 1. Además, se muestran los resultados obtenidos tras promediar anualmente los oligoelementos y macronutrientes. No se encontraron diferencias entre tratamientos para P, K, N y Fe. Por el contrario, se aprecia un aumento significativo en el contenido de Mg y Cu y una disminución leve del Ca en los árboles regados con AR, Tabla 1. Por último, los resultados extraídos del análisis de Clorofila total (Chl T) y a (Chl a) exponen un descenso de sus niveles en los tratamientos de AR, siendo más notable esta disminución en el T2, Tabla 2, dando lugar, por tanto, a la disminución de la tasa fotosintética (datos no mostrados). Es conocido que la salinidad del agua de riego disminuye la Chl T en cítricos. Asimismo, la concentración máxima en todos los tratamientos se presenta en la fase de postcosecha y la mínima en el inicio de la fase de crecimiento del fruto (datos no mostrados). Igualmente, se evaluó la variación del porcentaje de Chl a y b durante tres periodos fenológicos y los resultados indican un aumento de Chl a, tanto en hojas soleadas como sombreadas, durante el crecimiento y maduración del fruto, con la consecuente reducción del porcentaje de Chl b, pigmento accesorio que absorbe la energía luminosa que la clorofila a es incapaz de absorber. Esto puede ser consecuencia, entre más factores, del aumento de la intensidad luz que reciben las hojas durante la fase de crecimiento del fruto, ya que al aumentar ésta, la Chl b se descompone en mayor proporción que la Chl a.

4. CONCLUSIONES

El uso de AR para riego de plantas de pomelo mejora la EAU de las mismas. Sin embargo, disminuye ligeramente la EUN, en especial para el tratamiento Control. También se observa una disminución del contenido en clorofila, un descenso de los niveles de intercambio gaseoso en el Control de AR y una potencial acumulación de sales a nivel foliar, dando lugar a posibles riesgos en la sostenibilidad del cultivo a medio-largo plazo.

5. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se ha financiado por los proyectos SIRRIMED (KBBE-2009-1-2-03, PROPOSAL N° 245159), SENECA (05665/PI/07 and 11872/PI/09) y CICYT (AGL2010-17553).

6. REFERENCIAS

[1] Albrigo, G., Syvertsen, J. P., Dunlop, J. M. (2005). Growth conditions, crop load and fruit size affect sheeponing in grapefruit. Proc. Fla. State Hort. Soc. 118: 28-34.

[2] Cámara, J.M., García-Sánchez, F., Nieves, M., Cerdá, A. (2003). Effect of interstock ('Salustiano' orange) on growth, leaf mineral composition and water relations of one year old citrus under saline conditions. J. Hort. Sci. Biotech. 78:161-167.

[3] Evans, J.R., Poorter, H. (2001). Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance: the relative importance of specific leaf area and nitrogen partitioning in maximizing carbon again. Plant Cell Environ 24(8): 755-767.

[4] Levine, A.D., Asano, T. (2004). Recovering sustainable water from wastewater. Environ. Sci. Technol. 38(11):201-208.

[5] Lovatt, C.J., Zheng, Y.S., Hake, K.D. (1988). Demonstration of a change in nitrogen-metabolism influencing flower initiation in citrus. Israel J. Bot. 37 (2-4):181-188.

[6] Malavolta, E., Leao, H.C., Oliveira, S.C., Lavres, J., Moraes, M. F., Cabral, C.P., Malavolta, M. (2006). Reparticao de nutrientes nas flores, folhas e ramos da laranja cultivar natal. Revista brasileira de fruticultura 28(3):506-511.

[7] Romero-Trigueros C., Nortes P.A., Pedrero F., Mounzer O., Alarcón J.J., Bayona J.M. and Nicolás E. 2014. Assessment of the viability of using saline reclaimed water in grapefruit in medium to long term. Span. J. Agric. Res. 12(4):1137-1148.

Tabla 1. Valor promedio y error típico de los compuestos fitotóxicos y de los micronutrientes y macronutrientes foliares. Las diferentes letras indican las diferencias según Duncan (P<0.05).

	Sodio (%)	Boro (ppm)	Cloruros (%)	Cu (g/Kg)	Mg (%)	Ca (%)
T0	0.060±0.006a	64.900 ± 4.478a	0.480 ± 0.041a	9.785± 0.287a	0.284 ± 0.009ab	3.059 ± 0.193a
T1	0.064 ± 0.006a	67.310 ± 4.891a	0.474 ± 0.028a	8.525 ± 0.297a	0.253 ± 0.010a	3.220 ± 0.176a
T2	0.137 ± 0.012b	113.038 ± 5.412b	0.651 ± 0.027b	12.347 ± 0.827b	0.329 ± 0.008c	2.817 ± 0.213a
T3	0.115 ± 0.015b	100.064 ± 8.970b	0.662 ± 0.027b	9.328±0.331a	0.313 ± 0.006bc	3.000 ± 0.213a

Tabla 2. Valores promedio anuales y errores típicos de la Clorofila Total (Chl T) y la Clorofila a (Chl a). Variación del porcentaje del contenido de Chl a y Chl b en tres periodos fenológicos. Las diferentes letras indican las diferencias según el análisis estadístico Duncan (P<0.05).

	Promedio anual		Brotación y Floración		Crecimiento del fruto		Reposo vegetativo	
	Chl T (mg/g_{MF})	Chl a (mg/g_{MF})	Chl a (%)	Chl b (%)	Chl a (%)	Chl b (%)	Chl a (%)	Chl b (%)
T0	1.718 ± 0.066a	1.309 ± 0.0558a	73.56	26.442	77.41	22.67	75.82	24.21
T1	1.712 ± 0.080a	1.309 ± 0.058a	74.72	25.31	78.32	21.71	75.87	24.16
T2	1.600 ± 0.063a	1.194 ± 0.050a	73.88	26.15	78.04	22.00	76.48	23.54
T3	1.693 ± 0.541a	1.300 ± 0.0454a	73.03	27.00	76.95	23.08	75.78	24.24

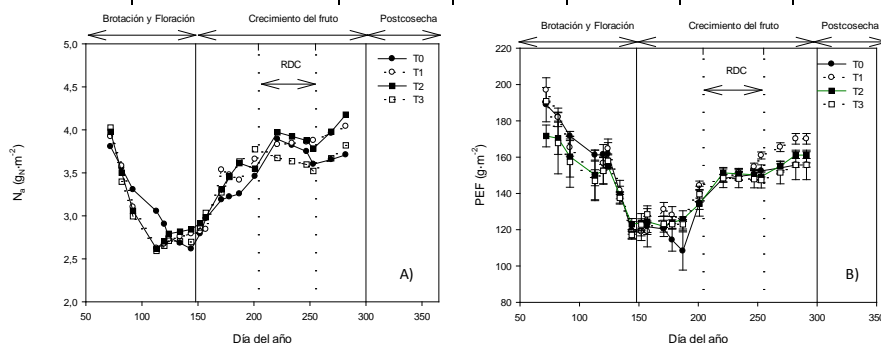


Figura 1. Tendencia del Nitrógeno en base al área (N_a) y del Peso específico foliar (PEF).

Transforming an agricultural patch into a public green area. El Palmeral de Zaraiche (Murcia)

Transformación de un espacio de cultivo en zona verde de uso público. El Palmeral de Zaraiche (Murcia)

F. Medina*¹, J. Ochoa²

¹Servicio de Parques y Jardines. Ayuntamiento de Murcia. Glorieta de España nº1. 30001 Murcia. Spain.

²Departamento de Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena.

Abstract

The end of horticultural activity in Zaraiche Palm Grove in 1975 did not lead to its loss. It has managed to survive until today, thanks to its privileged location on the most fertile soil within the irrigated cultivation land known as “Huerta de Murcia”. Its high landscape environmental and cultural value requires a set of measures, which make its transformation into a public green area a feasible project.

Keywords: urban parks; oasis; traditional irrigated cultivation land; *Phoenix*.

Resumen

El Palmeral de Zaraiche dejó de ser cultivado y fue abandonado hacia el año 1975. Este espacio agrícola ha llegado a nuestros días gracias a estar ubicado en un lugar privilegiado de la Huerta de Murcia. Del mismo modo que otros palmerales del levante español, el palmeral de Zaraiche alberga excelentes valores ambientales, culturales y paisajísticos. El trabajo se centra en el estudio histórico y paisajístico del palmeral, así como en las recientes intervenciones realizadas para su salvaguarda y transformación en zona verde, indicando las actuaciones necesarias para su correcta gestión.

Palabras clave: parques urbanos; oasis; huerta tradicional; *Phoenix*.

1. INTRODUCCIÓN

Los palmerales han formado parte de las huertas del levante español, constituyendo importantes elementos paisajísticos [1]. En el ámbito de la Región de Murcia destaca el denominado Palmeral Grande, localizado junto al carril al que le da nombre (Carril del Palmeral) en la Pedanía de Zaraiche, con una superficie aproximada a los 9,000 m² y una importante población de palmeras datileras.

Hasta los años 70 del siglo XX el Palmeral era el resultado de un complejo sistema productivo de explotación agraria en zonas áridas, generado a partir de un sistema de regadío muy singular, que permitía la aportación de caudales desde la Acequia Zaraiche por el poniente y el drenaje de sobrantes mediante el Azarbe del Cantino a levante. Dicho cauce era de obligada

* E-mail: francisco.medina@ayto-murcia.es

necesidad debido a la propia ubicación del palmeral en una zona de la Vega con problemas de encharcamientos y suelos con gran acumulación de sales. Esta última característica debió ser determinante para la plantación del palmeral. Hacia finales de los años 70 del siglo XX el Palmeral comenzó un periodo de deterioro a causa de los escasos cuidados que recibió, quedando abocado al abandono y su progresiva degradación. La presión urbanística fue el definitivo golpe que convirtió los magníficos suelos agrícolas de la Huerta de Murcia en activos de transacciones especulativas.

El Palmeral perdió las conducciones de riego y avenamiento, la tierra dejó de ser cultivada y los ejemplares de palmeras no recibieron las mínimas atenciones culturales siendo invadido de cañas (*Arundo donax*), carrizo (*Phragmites australis*) y sisca (*Imperata cylindrica*). El matorral seco, los restos de hojas, las basuras y escombros colmataron el terreno y propiciaron las condiciones del gran incendio que se produjo el 6 de septiembre de 2008. La huella del incendio se puede apreciar todavía en los troncos ennegrecidos, aunque solo los ejemplares que estuvieron sometidos a un fuego intenso llegaron a sufrir colapso.

Desde el punto de vista normativo, se le dotó de una amplia y detallada protección proporcionada por el Plan General de Murcia, desarrollada en las Normas Urbanísticas en el Título 10: *Normas para la Protección del Patrimonio Histórico Cultural y Natural*. Finalmente, la propiedad fue recibida por el Ayuntamiento de Murcia el 2 de julio de 2014, con el objetivo de ser convertida en zona verde para uso público.

El objetivo del presente trabajo se centra en el estudio del palmeral desde una perspectiva histórica e integradora en el paisaje, destacando los elementos y valores que lo configuran y que han de servir de base para su transformación en un parque urbano que conserve los valores culturales de la Huerta tradicional de Murcia.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En primer lugar se procedió a la identificación del palmeral, su contorno, paisaje circundante y sus elementos, realizando un inventario de palmeras existentes y valorando su estado de conservación actual. En los trabajos de inventario, se distinguió entre ejemplares únicos y múltiples o grupos. Se contabilizaron los estípites de cada uno de los grupos y se realizaron mediciones del total de ellos, bien correspondieran a ejemplares únicos, bien formaran parte de grupos. Se establecieron varias categorías de altura para la clasificación de las palmeras del siguiente modo: menor de 2,5 metros, entre 2,5 y 10 metros, entre 10 y 15 metros y mayor de 15 metros. Se identificaron los ejemplares por sexo y por último se realizó una valoración individual del estado sanitario. A continuación, se procedió a realizar un estudio documental histórico y normativo del palmeral. Seguidamente, se realizó un estudio consistente en visitas de campo y consulta documental de otros palmerales del levante español que han sido transformados en espacios verdes públicos, estudiando posibles similitudes y diferencias desde el punto de vista paisajístico y funcional. Se analizan estos nuevos espacios verdes y se plantea un conjunto de medidas y recomendaciones para la futura transformación del palmeral en parque urbano. Finalmente, se realizó una valoración patrimonial de los ejemplares siguiendo el método de Valoración Norma Granada [2] a partir del estudio de los valores de mercado de ejemplares de únicos y múltiples de palmera datilera procedentes de huertos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El conteo de palmeras arrojó la cifra de 302 ejemplares, de los cuales 187 se correspondieron con palmeras de estípite único (62% del total) y 115 con palmeras de troncos múltiples o grupos (38% del total). Esta relación, con un porcentaje elevadísimo de palmeras con

troncos múltiples, es indicativo de la degradación sufrida por el palmeral y de su evidente abandono desde los años 70 del siglo XX. Se contabilizaron un total de 610 estípites, de los que 424 pertenecieron a grupos y 187 a los ya reseñados ejemplares únicos. Por lo que respecta a la densidad de ejemplares por hectárea ésta fue de 335, valor que queda muy cercano al que muestran otros palmerales históricos de Elche (350 ud/ha). De un total de 277 ejemplares, 156 correspondieron a pies masculinos (56%) y 121 a pies femeninos (44%), lo que corrobora el abandono del palmeral durante años.

En la Tabla 1 se muestra el número de ejemplares únicos para cada una de las categorías de altura establecidas. A la vista de estos resultados, se dedujo un envejecimiento del palmeral, habiéndose encontrado más de la mitad de los ejemplares (52%) en las categorías de 10 a 15 y superior de 15 m de altura [3].

La revisión realizada en altura de los ejemplares, simultáneamente a las labores de escamonda ejecutadas en octubre de 2014, permitieron detectar un escaso daño de picudo rojo en la zona apical, lo que sugiere la innecesaria realización sistemática de tratamientos fitosanitarios. En los ejemplares, en los que se encontraron daños, éstos los presentaron en los hijuelos.

Del estudio documental se desprende que la primera reconversión de un palmeral en espacio público fue realizada en Elche en 1946, en el Huerto del Colomer: el Parque Municipal del Palmeral de Elche. Fiel al concepto de “bosque de palmeras”, y utilizando éstas como elementos arbóreos, se desarrollaron los elementos característicos del jardín público de la época: templete, kioscos, lagos, fuentes, etc. Treinta años después, y en la ciudad de Murcia, otro palmeral quedó engullido por el caserío, el huerto del Camino del Cementerio Viejo, que recibió un tratamiento similar al Huerto de Colomer. En el Palmeral de Orihuela los tratamientos de esa época difirieron poco de los anteriores. Una transformación realizada con muchos más medios fue la ejecutada sobre el Palmeral de Alicante, hasta casi convertirlo en un Parque Temático. La actuación sobre el Hort de Porta Morera (Elche) lo acabó dotando de todos los elementos actuales de los espacios públicos, pero su origen de huerto quedó irreconocible. Otras dos intervenciones más recientes, en el Parque Rey Jaume I en Elche y en el Palmeral de Santa Pola respectivamente, han sido más respetuosas con las trazas originales del huerto de palmeras, aunque es en el Huerto de San Plácido en Elche donde esto se percibe con más evidencia.

La valoración patrimonial a partir del estudio de los valores de mercado de ejemplares de únicos y múltiples de palmera datilera procedentes de huertos (Tablas 1 y 2) dio como resultado un importe de 354.498 euros.

4. CONCLUSIONES

Considerando el escaso número de palmerales en la Región de Murcia y el demostrado valor del sistema de huerta tradicional de Murcia, así como los diversos ejemplos de conservación de palmerales encontrados en el levante español, podemos asegurar que el Palmeral de Zairaiche posee importantes valores ambientales, culturales y paisajísticos que es necesario preservar. A pesar de las suficientes figuras administrativas de protección, se recomienda la revisión del Plan Parcial que le afecta, en aquellos extremos que pueda resultar contradictorio con las normas de protección.

La recuperación del palmeral debe contemplar labores de desfonde del terreno y posterior nivelación para permitir el establecimiento de surcos y tablares y facilitar un abundante riego para lavado de sales acumuladas en la tierra durante años. También es necesario asegurar la continuidad del sistema de regadío tradicional del Palmeral, manteniendo la funcionalidad de la Acequia Zairaiche y el Azarbe del Cantino.

La regeneración del vigor de los ejemplares del palmeral y su conservación pasa por la elaboración de un programa de podas bianual o trianual hasta la recuperación de dicho vigor, junto a la reposición de ejemplares afectados o abatidos. Asimismo, es necesario el control de malas hierbas mediante actuaciones reiteradas sobre el matorral mediante segado periódico y tratamiento químico dirigido a estos focos. En el aspecto sanitario se debe seguir insistiendo en el control del picudo, haciendo hincapié en los hijuelos, mediante la eliminación secuencial de aquellos que pudieran mostrar síntomas, al tiempo que se deberá sustituir paulatinamente el tratamiento químico por métodos biológicos.

Una vez establecidas las pautas para la viabilidad del Palmeral, la conversión en una zona verde de uso público requerirá de la redacción de un proyecto que contemple el establecimiento de andenes entre alineaciones de palmeras, consiguiendo una trama ortogonal que permita las labores necesarias y los tránsitos peatonales para el disfrute de los ciudadanos.

5. REFERENCIAS

- [1] Aviñó MacChesney, D. (2014). El paisaje de Huerta en Sharq al-Andalus: el Palmeral de Elche. Tesis Doctoral (Universidad de Murcia, Murcia, España).
- [2] AEPJP. (2006). Norma Granada. Método de valoración para árboles y arbustos ornamentales (Ed. Asociación Española de Parques y Jardines Públicos, Pozuelo de Alarcón, España).
- [3] Gracia i Vicente, L. (2007). Indicadores ambientales y paisajísticos del Palmeral de Elche. Tesis Doctoral (Universidad Miguel Hernández, Elche, España).

Tabla 1. Ejemplares únicos agrupados por alturas y valor de mercado

Intervalo de altura	Nº Ejemplares (Uds.)	Porcentaje (%)	Precio por metro lineal (€)
Menor de 2,5 metros	9	5	100
Entre 2,5 y 10 metros	83	44	80
Entre 10 y 15 metros	62	33	1000
Mayor de 15 metros	33	18	1200

Tabla 2. Valor de mercado de ejemplares múltiples

Número de estípites	Precio por grupo (€)
2	1700
3	1900
4	2100
5	2300
6	2500
7	2700
8	2900
9	3100

Root ABA signalling in salinized tomato Señalización de ABA en la raíz de tomate bajo estrés salino

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.

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.

* E-mail: amperez@cebas.csic.es

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 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. ACKNOWLEDGMENTS

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).. -2010-5 European Union).

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 Bio* 27, 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, 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, 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.). *Plant Funct Biol*. Accepted.

Tables and Figures

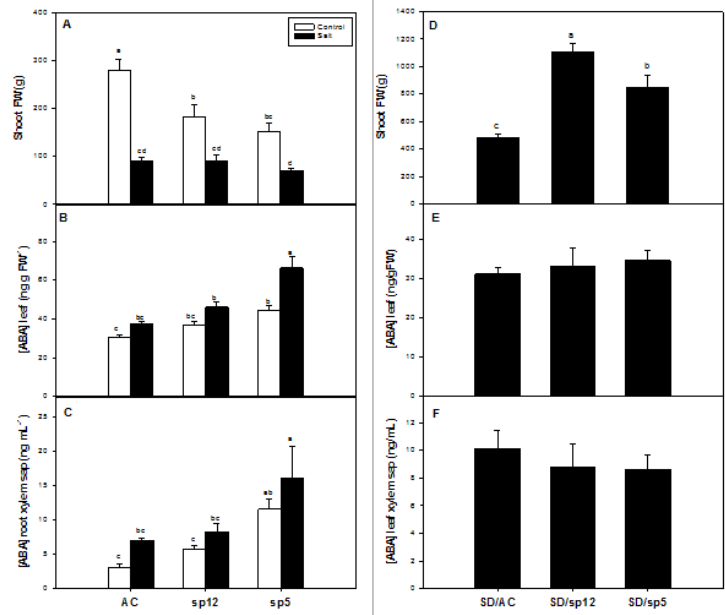


Figure 1. Final shoot FW (A), ABA concentration in the leaf (B) and in the root xylem sap (C) of the WT and the two transgenic lines after 21 days of hydroponic culture under control and salinity (100 mM NaCl) treatment. Final shoot FW (D), ABA in the leaf (E) and in the leaf xylem sap (F) of grafted 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 ± 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>JAZ</i>	1	285	122	300

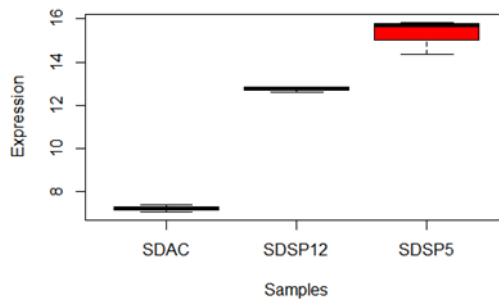


Figure 2. Expression values of Solyc07g056570.1.1, corresponding to *LeNCED1* gene in roots of grafted plants cultivated in commercial greenhouse for 200 days under 3.5 mS/cm EC

Variability of neonicotinoid tolerance in Mediterranean populations of *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae)

Variabilidad de la tolerancia a neonicotinoides en poblaciones mediterráneas de *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae)

V. Balanza*, J.E. Mendoza, P. Bielza

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

Abstract

O. 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. This compatibility has always been studied with commercial populations, rather than natural populations. From this point of view, the genetic variability of tolerance to two neonicotinoid insecticides in different Mediterranean populations of *O. laevigatus* was studied. There were significant differences in tolerance between populations in imidacloprid (5.5 times) and tiametoxam (8.4 times). Both neonicotinoids were very toxic to *O. laevigatus* as mortality at the field dose was higher than 60%, but tiametoxam was significantly more toxic (CL₅₀ baseline = 1.8 ppm) than imidacloprid (51.6 ppm).

Keywords: IPM, insecticides resistance, neonicotinoid.

Resumen

O. 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 enemigos naturales y algunos tratamientos fitosanitarios. Esta compatibilidad ha sido siempre estudiada con poblaciones comerciales y no tanto con poblaciones silvestres. Partiendo de este punto, se estudió la variabilidad genética de la tolerancia a dos insecticidas neonicotinoides en diferentes poblaciones mediterráneas de *O. laevigatus*. Existieron diferencias significativas entre las poblaciones de imidacloprid (5,5 veces) y tiametoxam (8,4 veces). Ambos neonicotinoides fueron muy tóxicos para *O. laevigatus*, ya que la mortalidad a la dosis de campo fue mayor del 60%, pero tiametoxam fue significativamente más tóxico (CL₅₀ línea base = 1,8 ppm) que imidacloprid (51,6 ppm).

Palabras clave: GIP, resistencia a insecticidas, neonicotinoides.

* E-mail: virgibalanza@hotmail.com

1. INTRODUCCIÓN

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

Debido a que algunas plagas eran difíciles de controlar solamente con productos químicos, fue prioritario desarrollar un programa de gestión integrada de plagas (GIP). Un principio clave del GIP es conseguir que los insecticidas utilizados no afecten a los agentes de control biológico, lo que requiere el conocimiento acerca de los productos químicos, los umbrales de pulverización y tiempos de aplicación que son compatibles con los enemigos naturales [2].

Imidacloprid y tiametoxam son insecticidas neonicotinoides que se utilizan hoy en día junto con los enemigos naturales en programas de GIP y son especialmente activos en especies de plagas de hemípteros [3].

En el presente estudio, se determinó la variabilidad genética de la tolerancia a dos insecticidas neonicotinoides, imidacloprid y tiametoxam, en 10 poblaciones mediterráneas de *O. laevigatus*, haciendo una línea de base de susceptibilidad de cada uno de los insecticidas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Recolección y cría de *Orius laevigatus*.

Se recolectaron un total de 9 poblaciones silvestres de *O. laevigatus* procedentes de distintos países mediterráneos y como referencia se utilizó una población comercial. Las poblaciones ensayadas fueron: Guadalupe (Cáceres-España), Métrida (Toledo-España), Catadoiro (Pontevedra-España), Palermo (Italia), Policoro (Italia), Cabo de Gata (Almería-España), Cazorla (Jaén-España), Logroño (La Rioja-España) y Teruel (Teruel-España).

Para la cría de las poblaciones se utilizaron botes de plástico de 1L, donde se dispusieron los individuos. Cada bote contenía: un vial con agua para proporcionar hidratación, una judía para la puesta de huevos, refugio y huevos de *Ephestia kuehniella* como alimento. Cada 48-72 horas se añadió alimento y extrajeron las judías con huevos de los botes. Estas judías se añadieron a un nuevo bote y así se realizó un nuevo ciclo de cría.

2.2 Preparación y lectura de los bioensayos.

Los bioensayos para cada una de las poblaciones fueron realizados con los neonicotinoides imidacloprid y tiametoxam. Se prepararon las siguientes dosis de insecticida: 10-300 mg L⁻¹ y 1-30 mg L⁻¹, respectivamente para imidacloprid y tiametoxam. A las dosis preparadas se añadieron secciones de judía de 3 cm. Las judías se agitaron junto con el insecticida y se dejaron secar para posteriormente añadirlas a una salsera que contenía alimento y refugio. En cada salsera se añadieron 10 individuos como mínimo. Se realizaron 3 repeticiones por dosis y un control de 3 repeticiones con judía sin tratar. El tiempo de duración de los bioensayos fue de 3 días para ambos insecticidas y transcurrido este periodo, se procedió a estimar la mortalidad.

2.3 Tratamiento estadístico.

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. Posteriormente se calculó la línea base de susceptibilidad, el factor de susceptibilidad natural (FS) y la mortalidad a la dosis de campo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el caso de imidacloprid (Tabla 1), se observaron diferencias significativas entre las CL_{50} de las distintas poblaciones, ya que los LF se solaparon. La dosis máxima de campo (DC) para imidacloprid es de 150 mg L⁻¹. En la Tabla 1 se observa que existen poblaciones con una CL_{50} más alta, como es el caso de Logroño y Guadalupe, y otras poblaciones como Métrida y Cabo de Gata, más sensibles a imidacloprid y, por lo tanto, con un valor de CL_{50} más bajo. No obstante, la mortalidad a la DC es superior al 60% en todos los casos y la línea base de susceptibilidad alcanzó un valor de 51,6 mg L⁻¹. El Factor de susceptibilidad (FS) llegó a ser de 5,5 para la población más resistente (Guadalupe), comparado con la población más sensible (Métrida) con un FS=1.

En la Tabla 2 se observaron diferencias significativas entre las CL_{50} de algunas poblaciones ensayadas con tiametoxam en las que se solaparon los LF. Podemos destacar la población comercial que fue muy sensible y obtuvo diferencias significativas con el resto de poblaciones. La DC para tiametoxam es de 100 mg L⁻¹. Hay que destacar que existió una alta mortalidad a la DC, siendo ésta superior al 90% en todos los casos, por lo que se observó que todas las poblaciones ensayadas fueron muy sensibles a tiametoxam, obteniendo así, un valor para la línea base de 1,8 mg L⁻¹. El valor más alto de CL_{50} =5,8 mg L⁻¹ y el FS=8,4 para Catadoiro, comparado con la población comercial que obtuvo unos valores de CL_{50} =0,70 mg L⁻¹ y un FS=1.

Los resultados de imidacloprid coinciden con algunos estudios, como los realizados por Delbeke et al. [2], Van de Veire et al. [4] y Angeli et al. [5]. En este último se comprobó que el imidacloprid era muy tóxico por contacto y ligeramente tóxico por ingestión para *O. laevigatus*. Otros autores mostraron también los efectos negativos de imidacloprid en otras especies de *Orius*, como Sabahi et al. [6], que indicó que la aplicación de este insecticida afecta a los parámetros de la tabla de vida de *O. albidipennis*. Phrabhaker et al. [7] mostraron también que *O. insidiosus* era variablemente susceptible a imidacloprid y tiametoxam después de 96h de exposición. Los resultados de tiametoxam también coinciden con ensayos realizados por Van de Veire y Tirry. [8], en el estudio se concluyó que el tiametoxam era muy tóxico y persistente para *O. laevigatus*.

4. CONCLUSIONES

Se observaron diferencias significativas entre las distintas poblaciones estudiadas para imidacloprid y para tiametoxam. La población comercial fue la más sensible en el caso de tiametoxam, obteniendo diferencias significativas con el resto de poblaciones, y más tolerante a imidacloprid. Se observó que ambos neonicotinoides fueron muy tóxicos para *O. laevigatus*, ya que la mortalidad a la dosis de campo fue mayor del 60%, pero tiametoxam fue significativamente más tóxico que imidacloprid.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos a mi compañera E. Martínez-Díaz por su ayuda técnica.

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., Vercruyssen, P., Tirry, L., De Clerco, 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] Nauen, R., Ebbinghaus Kintscher, U.L., Salgado, V., Kaussmann, M. (2003). Thiametoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pestic. Biochem. Physiol.* 76 (2), 55-69.

[4] Van de Veire, M., Sterk, G., Van der Staaij, M., Ramakers, PMJ., Tirry, L. (2002). Sequential testing scheme for the assessment of the side-effects of plant protection products on the predatory bug *Orius laevigatus*. *BioControl*. 47, 101-113.

[5] Angeli, G., Baldessari, M., Maines, R., Duso, C. (2005). Side-effects of pesticides on predatory bug *Orius laevigatus* (Heteroptera: Anthocoridae) in the laboratory. *Biocontrol Sci. Techn.* 15, 745-754.

[6] Sabahi, Q., Talebi, Kh., Kavousi, A., Sheikhi Garjan, A. (2010). Effects of imidacloprid, dichlorvos, pymetrozine and abamectin, on life table parameters of the predatory bug, *Orius albidipennis* (Hemiptera: Anthocoridae). *Journal of Entomological Society of Iran*. 30(1), 1-11.

[7] Prabhaker, N., Castle, S., Naranjo, S., Toscano, N., Morse J. (2011). Compatibility of two Systemic Neonicotinoids, Imidacloprid and Thiamethoxam, With Various Natural Enemies of Agricultural Pests. *J. Econ. Entomol.* 104(3), 773-781.

[8] Van de Veire, M., Tirry, L. (2003). Side effects of pesticides on four species of beneficials used in IPM in glasshouse vegetable crops: "worst case" laboratory tests. *Pesticides and Beneficial Organisms IOBC/wprs*. 26(5), 41-50

Tabla 1. Toxicidad de imidacloprid para 10 poblaciones de *O. laevigatus*.

Población	CL ₅₀ (mg L ⁻¹) ^a	LF (95%) ^b	FS-CL ₅₀ ^c	Mortalidad DC (%) ^d
Guadalupe	94,7	48,7-165,9	5,5	61,3
Méntrida	17,0	10,2-24,5	1,0	97,5
Catadoiro	77,2	38,9-147,5	4,5	63,1
Palermo	38,8	20,9-64,4	2,2	83,2
Policoro	77,6	47,8-108,7	4,5	75,9
Cabo de Gata	27,4	16,1-40,5	1,6	92,4
Cazorla	67,5	35,9-119,4	3,9	70,9
Logroño	92,6	63,0-127,2	5,4	64,5
Teruel	72,6	40,4-113,0	4,2	65,5
Comercial	48,7	28,9-74,9	2,8	84,4
Línea base	51,6	43,1-61,1		

(^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 (150 mg L⁻¹).

Tabla 2. Toxicidad de tiametoxam para 10 poblaciones de *O. laevigatus*.

Población	CL ₅₀ (mg L ⁻¹) ^a	LF (95%) ^b	FS-CL ₅₀ ^c	Mortalidad DC (%) ^d
Guadalupe	2,4	1,4-3,5	3,3	99,4
Méntrida	4,0	1,7-9,1	5,7	89,1
Catadoiro	5,8	1,6-14,9	8,4	95,0
Palermo	1,7	1,1-2,3	2,4	100
Policoro	1,4	0,7-2,1	2,0	99,7
Cabo de Gata	1,2	0,5-1,8	1,7	100
Cazorla	2,1	0,9-3,4	3,0	99,9
Logroño	4,0	1,9-4,5	5,7	99,7
Teruel	1,5	0,7-2,4	2,2	99,9
Comercial	0,7	0,4-1,0	1,0	100
Línea base	1,8	1,4-2,3		

(^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 (100 mg L⁻¹).

Nitrogen fertilizer recommendations for sweet pepper crop in greenhouses of Campo de Cartagena

Recomendación de abonado mineral nitrogenado en el cultivo de pimiento de invernadero en el Campo de Cartagena

J. Navarro^{*1}, F.M. del Amor², J. Cánovas²

¹Consejería de Agua, Agricultura y Medio Ambiente. Plaza Juan XXIII, s/n. 30008 –Murcia. Spain

²Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agroalimentario. C/ Mayor, s/n. 30150-La Alberca, Murcia. Spain

Abstract

In 1999 an experiment was designed in a greenhouse with eight drainage lysimeters (7x7x0.90 m) to study nitrate leaching in a sweet pepper crop. From 1999 to 2001 we tested different doses of mineral nitrogen fertilization and from 2002 to 2006 different farming techniques (organic, integrated and conventional). The aim of those experiments was to assess losses of nitrates from drainages and to study crop yield response as representative soil conditions in the region (Campo de Cartagena, Murcia, Spain). According to N supply, soil characteristics and water composition, we concluded that the supply of 15 g of N per m², with the addition of 4 kg of manure was enough to maintain similar yield (10 t per ha) compared with traditional N-fertilizer practices in the region (30-40 g per m²). Our results can help to reduce the environmental impact of this crop.

Keywords: Leaching; *Capsicum anuum*; *L.*; mineral nitrogen.

Resumen

En el año 1999 se diseñó un experimento en 8 lisímetros de drenaje de 7x7x0,90 m³ bajo invernadero, para estudiar la lixiviación de nitratos en un cultivo de pimiento. Desde el año 1999 hasta 2001 se han ensayado diferentes dosis de abonado mineral nitrogenado y desde el año 2002 hasta el 2006 diferentes técnicas de cultivo (ecológico, integrado y convencional), que han permitido evaluar las pérdidas de nitratos en el drenaje y obtener conclusiones sobre la producción, extrapolables a condiciones similares de suelo de la Comarca del Campo de Cartagena. Teniendo en cuenta los aportes de N del estiércol, el suelo y el agua y como resultado del estudio, se concluyó que con dosis de 1,5 UF de N mineral por tonelada de producción prevista (15 g N/m²) para una producción de 10 Tm/Ha (la media en la Comarca), combinado con el aporte de 4 kg de estiércol/m², era suficiente para obtener buenas producciones con menor impacto medioambiental en comparación con las que se aplican en la Comarca y que están entre los 30 y 40 g N/m².

Palabras clave: Lixiviación; *Capsicum anuum*; *L.*; fertilización.

1. INTRODUCCIÓN

La aplicación excesiva de fertilizantes nitrogenados, que favorece el crecimiento vegetativo y viene acompañada de una menor producción, es considerada una sobre-fertilización [1]. Un

* E-mail: Joaquin.navarro@carm.es

aporte óptimo de N es esencial para el desarrollo de las plantas y para la productividad y longevidad de los cultivos hortícolas [2]. Al combinar una fertilización mineral con una orgánica en dosis elevadas, se obtiene un excesivo crecimiento vegetativo de las plantas de pimiento y una disminución en la producción [3].

El objetivo de estos ensayos es establecer recomendaciones de abonado mineral nitrogenado en el cultivo de pimiento bajo invernadero que tengan un bajo impacto medioambiental en cuanto a la lixiviación de nitratos se refiere y que no afecten a la producción.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se ubicaron en de un invernadero multicapilla de dimensiones 32 x 40 m², con ventilación cenital, humidificación por fog-system y riego por goteo, situado en el Centro Integrado de Formación y Experiencias Agrarias de Torre-Pacheco (Murcia).

Durante los años 1999, 2000 y 2001 se aplicó el mismo abonado P-K a todas las parcelas y se ensayaron 4 tratamientos de abonado mineral nitrogenado T-1, T-2, T-3 y T-4 (0, 15, 30 y 45 g N/m²). Durante el año 2002 todas las parcelas tuvieron el mismo abonado, durante los años 2003 y 2004 se realizaron los siguientes tratamientos:

Tratamiento ecológico (T-E). La fertilización de estas parcelas se realizó antes de la plantación con la aplicación de estiércol fermentado, a razón 4 Kg/m².

Tratamiento integrado (T-I). La fertilización de estas parcelas se realizó mediante la aplicación de abonos minerales empleando unas dosis inferiores a las máximas establecidas en las Normas Técnicas recomendadas en la Región de Murcia para la Producción Integrada. Se aplicaron en torno a 15 g N/m².

Tratamiento convencional (T-C). Siguiendo las prácticas habituales de los agricultores de la zona, los abonos empleados fueron los mismos que en el tratamiento integrado, pero las dosis aplicadas fueron el doble que en el T-I, superando ligeramente el límite superior establecido en las Normas Técnicas para la Producción Integrada. Se aplicaron en torno a 30 g N/m².

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Efecto de los diferentes tratamientos de abonado sobre la producción de pimientos.

La recolección de pimientos se realizó cada año desde principios de abril hasta finales de julio. Haciendo el análisis de la varianza de los datos de producción total (ANOVA con el abonado mineral como factor) se pone de manifiesto que, al nivel del 95%, no se aprecia efecto significativo de los tratamientos sobre las producciones, es decir, la reducción del abonado mineral no ha acusado descenso de producción ninguna de las campañas. Únicamente hay diferencias significativas durante el año 2003, en que la producción total en el cultivo ecológico fue un 30% superior que en el cultivo integrado y casi un 41% mayor que en el cultivo convencional; pero este año no es representativo por lo corto del ciclo (menos de 5 meses).

3.2 Balance de nitrógeno y relación con la producción.

Respecto al nitrógeno disponible para el cultivo, con el agua de riego se aportaron como media 1,1 g/m² de NO₃⁻, que equivalen a 0,25 g N/m², lo que apenas supone entre el 2 y el 0,5% del nitrógeno mineral aportado en la fertilización. En cuanto al nitrógeno liberado por el estiércol aportado, se calcula tras realizar los análisis en una media de 9 g N/m², y el de la materia orgánica del suelo de 2,5 g N/m². Esta cantidad de nitrógeno liberado por la enmienda orgánica y la materia orgánica del suelo está entre un 64% y un 22% del nitrógeno mineral aportado y ha sido, por lo tanto, la principal fuente de nitrógeno del tratamiento sin abonado mineral y explicaría en

parte el hecho de que durante seis años consecutivos no se haya notado la disminución de producción. La relación entre la variable de estudio (nitrógeno lixiviado) y los tratamientos nos da tres subconjuntos homogéneos aplicando el test HSD de Tukey de comparaciones múltiples para un intervalo de confianza del 95%, que se pueden apreciar en la tabla 1 y en el gráfico 1, en kg N/ha lixiviado. Para el conjunto de las 8 anualidades el subconjunto de T1, T2 y TE estaría por debajo de 150 kg N/ha lixiviado, TI por debajo de 150 kg N/ha y T3, TC y T4 por encima de esta cantidad, indicando una mayor potencialidad de contaminación por nitratos. En lo que se refiere a la producción, las estadísticas, con un coeficiente de correlación lineal significativo a un nivel del 95% de probabilidad, nos indican que no existe efecto de la cantidad de nitrógeno sobre la producción, bajo las condiciones de los ensayos.

4. CONCLUSIONES

Durante el desarrollo de esta investigación se ha conocido que dosis de nitrógeno inferiores a las que habitualmente se aplican en la zona dan lugar a una producción similar a la que es normal en ésta. La dosis de 15 g N/m² de abono mineral (nitrato cálcico + nitrato potásico) combinada con el aporte estimado de 10 g N/m² proveniente del estiércol y del agua de riego se ha mostrado como la más eficaz en relación con la producción y lixiviación de nitratos.

El abonado que creemos debería aplicarse en condiciones similares de suelos y cultivo para mantener los niveles de producción de pimientos con menor impacto medioambiental sería el reflejado en la tabla 2, que se compara con los datos medios de extracciones dadas por diversos autores y con el máximo recomendado por las Normas técnicas de Producción Integrada en la Región. Estas dosis de abonado mineral que recomendamos combinadas con el aporte anual de 4-5 kg/m² de estiércol fermentado, se considera suficiente para obtener buenas producciones con menor impacto medioambiental.

La disminución del abonado nitrogenado de origen mineral es compatible con el mantenimiento de buenos niveles productivos, es más sostenible desde el punto de vista medioambiental y permite disminuir los costes de producción.

5. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada por el INIA y el IMIDA Se agradece su colaboración en la cesión de los terrenos al Centro Integrado de Formación y Experiencias Agrarias de Torre-Pacheco (Murcia).

6. REFERENCIAS

- [1] Weinbaum, S.A., Johnson, R.S. and Dejong, T.M. (1992). Causes and consequences of overfertilisation in orchards. *Hort. Technology*. 2, 112-120.
- [2] Aloni, B., Pashkar, T., Karni, L. and Daie, J. (1991). Nitrogen supply influences carbohydrate partitioning of pepper seedlings and transplant development. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 116, 995-999.
- [3] Aliyu, L. (2000). Effect of organic and mineral fertilizers on growth, yield and composition of pepper (*Capsicum annum* L.). *Biol. Agric. Hortic.* 18, 29-36.

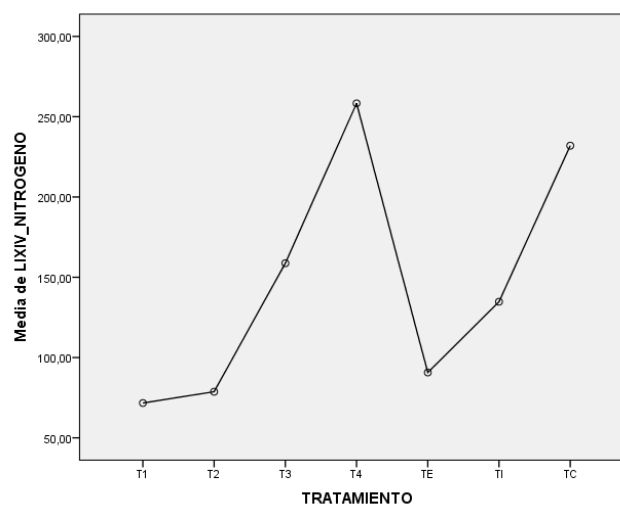
Tabla 1. Lixiviación de N en kg/ha por tratamiento. Media de 7 años.

TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
T1	6	71,6900		
T2	6	78,7217		
TE	10	90,6870		
TI	13	134,7546	134,7546	
T3	6	158,7617	158,7617	158,7617
TC	9		231,9400	231,9400
T4	6			258,3000
Sig.		,259	,155	,136

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Tabla 2. Abonado medio recomendado en pimiento de invernadero comparado con el estimado para compensar las extracciones y el máximo de la Normas Técnicas de P.I. en la Región de Murcia (año 1998 y año 2002).

g/m ²	RECOMENDADO	EXTRACCIONES	NORMAS P.I.	
	ENSAYOS	Media (horquilla)	Año 98	Año 02
N	15	40 (29-52)	50	40



Gráfica 1. Medias de todas las anualidades de nitrógeno lixiviado (kg/ha) por tratamiento.

Advances in biomechanical consolidation of monumental *Ficus macrophylla* trees in San Francisco Square (Cartagena)

Avance de resultados en la consolidación biomecánica de *Ficus macrophylla* monumentales de la plaza de San Francisco (Cartagena)

M.A. Guillén*¹ M. Gutiérrez², J. Ochoa³

¹Jefe Servicio de Parques y Jardines, Ayuntamiento de Cartagena, C/ San Miguel, 8, 30201 Cartagena. Spain.

²Podador europeo de *Fomento de Construcciones y Contratas, S.A*, C/ Luis Pasteur, 8, 30203 Cartagena. Spain.

³Departamento de Producción Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena

Abstract

The renewal of the Plaza de San Francisco, in the city center of Cartagena (Spain), proved to be the opportunity to carry out a singular experience, not foreseen in the original project, on the monumental trees (*Ficus macrophylla*) in this historic urban space. The results of interventions to improve structural stability by means of non-artificial consolidation are described, promoting the growth of its adventitious roots, until they become the pillars necessary to ensure a proportional development controlled and the longevity of specimens, avoiding unnecessary structures and avoiding excessive pruning events.

Keywords: Natural stability; singular trees; tree heritage.

Resumen

La remodelación de la Plaza de San Francisco, en el centro urbano de Cartagena (España), resultó ser la oportunidad para materializar una experiencia singular, no prevista en proyecto original, sobre el arbolado monumental (*Ficus macrophylla*) de ese espacio urbano histórico. Se describen los resultados de las intervenciones realizadas para mejorar su estabilidad estructural mediante consolidación no artificial, potenciando el crecimiento de sus raíces adventicias, hasta convertirlas en los pilares necesarios que aseguren un desarrollo proporcional controlado y la longevidad de los ejemplares, evitando artificios y podas innecesarias.

Palabras clave: Estabilidad natural; arbolado singular; patrimonio arbóreo.

1. INTRODUCCIÓN

La reciente remodelación de la trama superficial de la *Plaza de San Francisco* no contemplaba actuaciones en cuatro árboles monumentales (*Ficus macrophylla*) [1], pero gracias a

* Email: guillen@ayto-cartagena.es

la decisión de dejarlos en proyecto y a admitir nuestra propuesta de intervención, se puso en marcha un trabajo experimental [2] de aplicación de medidas para fomentar su estabilización, favoreciendo el desarrollo de las raíces aéreas como pilares naturales, fundamentadas en experiencias iniciadas en el Vivero Municipal de Cartagena entre los años 1991 y 1998.

Aunque en el ámbito profesional existe interés creciente por técnicas que incrementen la seguridad en la gestión del arbolado monumental, éste municipio cuenta con una historia relativamente reciente en lo relativo a protección de árboles singulares [3], a la par que la mayoría de las demandas vecinales [4] siguen siendo proclives a podar y terciar, a pesar de tratarse de un paisaje local escaso en arbolado. Probablemente, la ciudad esté influenciada por el temor a otro accidente como el ocurrido en la ciudad de Murcia en el año 2000, lo que llevó a decidir no plantar ficus y a colocar estructuras de protección artificiales en ejemplares de grandes dimensiones [5]. Sin ser los árboles más antiguos en ese espacio urbano (1923-1925), su permanencia en la plaza recuerda el ambiente romántico del proyecto modernista del siglo XIX [6], lo que también ha servido para reconocimiento al arbolado como contribuyentes clave en la conservación y habitabilidad de un entorno histórico.

El género *Ficus sp.* sigue estando muy presente en la jardinería pública mediterránea española, de Cádiz a Barcelona, desde finales del siglo XIX, lo que se traduce en la existencia de un patrimonio arbóreo de gran valor. Por todo lo anterior, se consideró como objetivo la evaluación de la mejora de la estabilidad en ejemplares de *Ficus macrophylla*, como modelo a seguir por otras ciudades, donde éstos especímenes son considerados iconos del paisaje.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Conforme a los resultados preliminares se realizaron las siguientes actuaciones, que han sido incluidas en el *Programa operativo anual de Gestión del Arbolado Singular*:

2.1 Ramas.

Poda selectiva con medios articulados o con equipo de trepa, limitada a criterios fitopatológicos y biomecánicos de reducción de sobrepeso en la cúpula exterior, ramas secas y codominancias, aclareo entre árboles seleccionando brotes, refaldeo reducido a las normas de accesibilidad, controlando distancias a fachadas según Código Civil.

2.2 Pilar de seguridad complementario

A la vista de los informes que confirman el buen estado estructural de la rama más horizontal y para dejar libre el pandeo natural, no limitando la resistencia natural, se descarta la idea inicial de construir un pilar de recepción (viga de acero perfil IPN, con capitel curvo con caucho y forrado todo de tramos de madera entrecruzada, a imitación de puntales mineros).

2.3 Cuello

Se continuó con el lavado diario de cuellos y riego auxiliar en época estival y de sequía, a fin de mitigar efectos negativos del estrés a que suelen estar sometidos en estas latitudes.

2.4 Raíces

Repaso de las protecciones de enfajado en malla de fibra de coco, armado a tutores de madera. Se realiza algún autoenraizamiento donde se observa debilidad. Para facilitar el desarrollo, se retira fajas donde las raíces de 10-12 cm ya han tocado el suelo. Humidificación de raíces aéreas, a agua muerta, mojando la estructura mallada que cubre las raíces colgantes.

2.5 Suelo.

Se repone el *mulching* de parterres, a base de aporte de triturado de madera de olivo y frutales de hueso. Está creándose un manto de raicillas absorbentes superficiales.

2.6 Control de crecimiento de raíces adventicias

En abril de 2016 vuelve a tomarse referencias del nivel de crecimiento de la zona apical en las enfajadas de cada grupo de dos árboles (Norte y Oeste de la plaza).

2.7 Hojas

Para evitar pérdida de frondosidad, se incrementan riegos y se eliminan podas de follaje.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A la vista de la información recopilada y de informes y evaluaciones realizados desde el Servicio Municipal de Parques y Jardines, se obtienen los resultados mostrados en la Tabla 1.

Salvo por interferencias ajenas (desgarros, manipulación de enfajados, hurto de tutores, rotura de brotaciones, fijación de vientos y tensores en escenarios públicos, grifos para casetas de ferias, orines y heces de perros, instalación de armarios de alumbrado para fiestas y hasta depositar un generador...), se comprobó que las raíces fúlcreas mantuvieron la humedad diferenciada y aumentaron su crecimiento. De las 17 raíces sobre las que se aplicó esta técnica de consolidación biomecánica (Fig. 1) en agosto de 2013, un 52 % alcanzaron el suelo en abril de 2016. El 50% del resto (raíces "G", "D" y "H" del grupo Norte y la raíz "H" del grupo Oeste) se vieron muy afectadas por ese vandalismo, incluido incendio del enfajado de la raíz "H". El crecimiento en longitud de las raíces se incrementó considerablemente desde el inicio, pasando de una media de 2,5 antes de la prueba a 33,7 cm/año, con una máxima de 76 cm/año en la raíz Norte "E". Se observó también incremento de emisión de raíces superficiales sobre los parterres. Queda pendiente corroborar resultados de estimulación en las raíces "F" y "G" del grupo Norte.

La retirada de toda vegetación y la eliminación de rastrillados bajo los *Ficus macrophylla*, aportando dos acolchados desde 2014, ha evitado competencia inter-radicular, mejorando el ambiente para su conservación, dando evidencias de uniformidad en la imagen (árbol y tierra).

4. CONCLUSIONES

De los trabajos iniciados con idea de mitigar durante las obras el estrés en los cuatro *Ficus macrophylla*, modificando las condiciones ambientales en las raíces fúlcreas, puede afirmarse que:

Se constató que los lavados y riegos de humectación en periodos de sequía estimularon el crecimiento radicular, mejorado el aspecto foliar con apariencia de buen estado sanitario, favoreciendo el crecimiento de un alto porcentaje de las raíces fúlcreas entutoradas y enmalladas, de las que más de la mitad han tocado suelo. Las previsiones pasan por alcanzar un mayor desarrollo del previsto sin ésta técnica en estas latitudes y, consecuentemente, un incremento en la estabilidad natural del arbolado. Los lavados y riegos de humectación en periodos de sequía pueden coadyuvar a otros factores como luz y temperatura para favorecer el crecimiento y posterior desarrollo radicular, mejorado el aspecto foliar y la apariencia de buen estado sanitario.

Los árboles han mejorado su estado y aspecto. A estos hitos de arquitectura natural, se añade esta nueva arquitectura de sustentación mimetizada, que también se ha convertido en un valor añadido a la imagen del entorno.

Se observa interés en la aplicación de la técnica para anclaje de raíces en comunidades autónomas como la valenciana, donde durante el año 2016 el *Observatorio Municipal del Árbol de Valencia* (OMAV), servicio de referencia nacional en trabajos de arboricultura, ha divulgado el comienzo de las actuaciones en ficus presentes en los jardines de la Glorieta (Valencia).

5. AGRADECIMIENTOS

A Pedro José Cifuentes Rosso, jefe de contrata de jardines en Cartagena de FCC, S.A., por su colaboración, permitiendo que su personal arborista participara en este estudio.

6. REFERENCIAS

- [1] López, J., Pérez, V. (2012), Proyecto de reforma de la Plaza de San Francisco. Ayuntamiento de Cartagena.
- [2] Guillén, M.A., Franco, J.A., Ochoa, J. (2014). Consolidación biomecánica de *Ficus macrophylla* monumentales en la reforma de la plaza de San Francisco de Cartagena: resultados preliminares. III Workshop WiA3.14. Cartagena: Universidad Politécnica de Cartagena, Servicio de Documentación, 2014. 120-123 p. ISBN: 978-84-697-1358-7
- [3] Martínez, M.D., Ochoa J., Sansano A., Guillén, M.A., (2014). Catálogo de árboles singulares y conjuntos arbóreos del Plan General de Ordenación Urbana de Cartagena. Ayuntamiento de Cartagena.
- [4] Ayuntamiento de Cartagena (2016). Programa de Órdenes de Trabajo del Área de Infraestructuras.
- [5] Diario La Verdad, Editorial (2015). Anclajes en 14 ficus para evitar la caída de ramas. Edición de Murcia Diario La Verdad 12/09/2015.
- [6] Mancha, C. (1874). Proyecto de Glorieta ajardinada Plaza Valarino Togoires. Archivo Municipal de Cartagena



Figura 1. a: Imagen parcial de consolidación biomecánica y b: detalle de enraizamiento

Tabla 1. Control de medida de raíces (cm)

GRUPO	RAÍZ	COTA 0	COTA 1	COTA 2	COTA 3	COTA 4	COTA 5	COTA 6	COTA 7	COTA 8	COTA 9	COTA 10	TOTAL	
		30/07/13	16/08/2013	19/09/2013	17/10/2013	19/11/2013	17/02/2014	21/04/2014	28/07/2014	31/10/2014	21/07/2015	07/04/2016		
NORTE	A	-	20	26	30	18	5	5	10	EN SUELO			114	
	B	-	25	21	14	17	3	3	15	EN SUELO			98	
	C	-	30	8	EN SUELO									38
	D	-	15	16	15	0	0*	0*	25	25	5	5	106	
	E	-	12	20	0	0	0*	0*	35	35	25	25	152	
	F	-	5	EN SUELO									5	
	G	-	15	4	10	NUEVA	10	10	30	30	0	0	109	
	H	-	No instalada				NUEVA	3	3			5	5	16
OESTE	A	-	10	13	25	24	5	5	15	EN SUELO			97	
	B	-	10	13	20	0	5	5	20	20	12	12	117	
	C	-	10	25	38	20	8	5	12	13	20	20	171	
	D	-	15	36	EN SUELO									51
	E	-	13	22	Alterada	Alterada	10	10	EN SUELO			55		
	F	-	30	17	0	14	10	10	EN SUELO			81		
	G	-	0	0	5	5	0	0	10	25	15	10	80	
	H	-	No instalada		No instalada	No instalada	NUEVA	3	3		20	20	46	
	I	-	No instalada		No instalada	No instalada	No instalada	NUEVA			50	50	100	

Synergism studies with binary mixtures of pyrethroid, carbamate and organophosphate insecticides on *Frankliniella occidentalis* (Pergande)

Estudios de sinergismo con mezclas binarias de piretroides, carbamatos, insecticidas organofosforados, sobre *Frankliniella occidentalis* (Pergande)

J. Abellán*, P.J. Espinosa, V. Quinto, J. Contreras, P. Bielza

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

Abstract

The major mechanism of resistance to most insecticides in *Frankliniella occidentalis* is metabolic. The efficacy of insecticide mixtures of acrinathrin, methiocarb, formetanate and chlorpyrifos was studied by topic exposure in strains of *F. occidentalis* selected for resistance to each insecticide. Acrinathrin activity against *F. occidentalis* was enhanced by carbamate insecticides, being methiocarb much better synergist than formetanate. Monooxygenases action on the carbamates would prevent degradation of the pyrethroid, hence providing a level of synergism by competitive substrate inhibition.

Keywords: Thysanoptera; insecticide-resistance; insecticide-mixtures.

Resumen

El principal mecanismo de resistencia a la mayoría de insecticidas de *Frankliniella occidentales* (Pergande) es metabólico. La eficiencia de las mezclas de insecticida con acrinatrín, metiocarb, formetanato y clorpirifos, se estudió por exposición tópica en poblaciones de *F. occidentalis* seleccionadas para la resistencia a cada insecticida. La actividad del acrinatrín contra *F. occidentalis* se potenció con los insecticidas carbamatos, siendo el metiocarb un sinergista mucho mejor que el formetanato. La acción de las monooxigenasas sobre los carbamatos prevenía la degradación del piretroide, dotando así de un nivel de sinergismo a través de la inhibición competitiva del sustrato.

Palabras clave: Thysanoptera; resistencia a insecticidas; mezclas de insecticidas.

1. INTRODUCCIÓN

El trips occidental de las flores, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), es una de las mayores plagas de hortalizas, frutales y cultivos ornamentales en áreas de producción con clima cálido. Muchas poblaciones de *F. occidentalis* han mostrado resistencia a una serie de diferentes

* E-mail: jaimeabellan@hotmail.com

insecticidas. Su facilidad a desarrollar resistencia cruzada a los insecticidas del mismo grupo químico y a aquellos de otras clases sugiere la existencia de un mecanismo de resistencia metabólico. Diferentes mecanismos de resistencia hacia diferentes insecticidas contribuyen a la resistencia. Sin embargo, un estudio reciente sugiere que el principal mecanismo de resistencia a la mayoría de insecticidas en *F. occidentalis* es metabólico, suprimible con butóxido de piperonilo, mediado con citocromo P450 monooxigenasas y generador de resistencia cruzada entre diferentes clases de insecticidas [1,2].

Dado el desarrollo de la resistencia en *F. occidentalis* se llevó a cabo una investigación sobre las diferentes combinaciones de OPs (clorpirifos), carbamatos (metiocarb y formetanato) y piretroides (acrinatrín) para estudiar el sinergismo en poblaciones susceptibles y resistentes seleccionadas en laboratorio.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Insectos

La población susceptible (MLFOM) de *F. occidentalis* se recogió en 2001 de un cultivo ecológico de melocotonero situado en una zona (Murcia, sureste de España) de cultivos frutícolas donde no había mucho uso de insecticidas. Esta población se mantuvo en el laboratorio. Las poblaciones seleccionadas para la resistencia a cada uno de los insecticidas: MET9 (metiocarb), ACR9 (acrinatrín), y FOR7 (formetanato), se mantuvieron en el laboratorio [3-6]. La resistencia se mantuvo por una continuada presión de selección.

2.2 Insecticidas

Las formulaciones comerciales de los diferentes insecticidas usados para los bioensayos fueron: formetanato 500 g kg⁻¹ WP (Dicarzol, Aventis), acrinatrín 75 g L⁻¹ EC (Rufast, Rhône-Poulenc), metiocarb 500 g kg⁻¹ WP (Mesurol, Bayer), y clorpirifos 480 g L⁻¹ EC (Dursban, Syngenta).

2.3 Bioensayos

Se usaron bioensayos tópicos para ensayar la resistencia del adulto a cada insecticida en la población seleccionada correspondiente. Solo se usaron trips hembras. La serie de disoluciones de acrinatrín y metiocarb se preparó en acetona, así como el formetanato se diluyó en metanol. Se ensayaron por un lado los insecticidas (Acrinatrín, Metiocarb y Formetanato), para cada una de las poblaciones seleccionadas (MLFON, MET9, ACR9, FOR7). Y luego combinaciones de estos tres insecticidas, usando otro como sinergista el (acrinatrín, metiocarb y clorpirifos). Para el clorpirifos y el acrinatrín se usó la mitad de la dosis máxima de campo (DMC) y para el metiocarb se usó al 3 % de la DMC. Las concentraciones sinergistas fueron: 480 mg L⁻¹ para el clorpirifos, 30 mg L⁻¹ para el acrinatrín, y 31,2 mg L⁻¹ para metiocarb. Seis concentraciones de insecticidas, más un tratamiento control con acetona o metanol, se ensayaron para cada población en tres repeticiones, conteniendo 10 adultos por repetición. La mortalidad se evaluó después de 24 horas, los individuos inmóviles se contaron como muertos.

2.4 Análisis de Datos

Los datos se recogieron con la mortalidad observada en el control y analizados usando el programa POLO-PC para el análisis probit.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los bioensayos de *F. occidentalis* con los insecticidas solos y con las mezclas, se muestran en la Tabla 1. El formetanato, el metiocarb y el acrinatrín muestran

resistencia cruzada. La población seleccionada a formetanato (FOR7) resultó ser moderadamente resistente al formetanato ($FR_{50} = 13,4$), al metiocarb ($FR_{50} = 11,0$) y al acrinatrín ($FR_{50} = 18,8$). La población seleccionada al metiocarb (MET9) resultó ser ligeramente resistente al mismo ($FR_{50} = 6,5$), mostrando una resistencia moderada al acrinatrín ($FR_{50} = 24,6$). La población seleccionada al acrinatrín (ACR9) mostró una resistencia muy alta al acrinatrín ($FR_{50} = 1029,6$) y una resistencia leve al metiocarb ($FR_{50} = 6,8$).

En la población seleccionada a formetanato (FOR7), aunque el clorpirifos incrementó la toxicidad del formetanato, la CL_{50} y CL_{90} no eran significativamente diferentes de aquellas del formetanato solo. El metiocarb y el acrinatrín produjeron sinergismo de formetanato a los niveles CL_{50} y CL_{90} . El sinergismo del metiocarb y acrinatrín en la población resistente a formetanato era ligero a la CL_{50} ($RS = 4,9$ y $4,5$, respectivamente) y alto a la CL_{90} ($RS = 25,3$ y $11,8$, respectivamente).

En la población seleccionada a metiocarb (MET9), el clorpirifos produjo un leve sinergismo del metiocarb a la CL_{50} ($RS = 2,7$), pero no significativamente a la CL_{90} ($RS = 3,5$). El acrinatrín se mostró altamente sinergista (15,4 veces) con metiocarb a la CL_{50} , pero no a la CL_{90} . Su efecto restauró completamente la susceptibilidad de *F. occidentalis* al metiocarb en la CL_{50} .

El clorpirifos no causó ningún sinergismo con acrinatrín en la población seleccionada del mismo (ACR9). En cambio, el metiocarb presentaba una elevada sinergia al acrinatrín en la CL_{50} (1772,1 veces) y en la CL_{90} (2103,2 veces). Esto redujo el valor del FR_{50} de 1029,6 a 0,6, restaurando completamente la susceptibilidad de *F. occidentalis* al acrinatrín.

Se ha propuesto un modelo general para explicar el sinergismo entre insecticidas: “un tóxico interfiere en la detoxificación metabólica del segundo, potenciando así la toxicidad de este último compuesto”. Los piretroides y los insecticidas organofosforados pueden ser sustratos competitivos para la misma oxidasa, incrementando así la toxicidad de la mezcla. Del mismo modo, los carbamatos pueden inhibir las monooxigenasas involucradas en la resistencia a los piretroides.

En el presente estudio una concentración muy baja de metiocarb (aproximadamente, el 3 % de la dosis máxima de campo), fue extremadamente sinergista con el acrinatrín (aprox. 2000 veces) (tabla 1). Este hecho sugiere que una acción menos eficiente de las monooxigenasas sobre el metiocarb prevendría la degradación del acrinatrín.

En cambio, el acrinatrín era altamente sinérgico al metiocarb (15 veces) al nivel CL_{50} pero no al CL_{90} (Tabla 1). Este hecho podría explicarse debido al efecto sinérgico del metiocarb con el acrinatrín, en puesto del acrinatrín con el metiocarb. A bajas concentraciones, la toxicidad del metiocarb era muy baja, pero el metiocarb producía sinergismo de una baja concentración de acrinatrín (50% de la dosis máxima de campo), incrementando la toxicidad del acrinatrín. Por el contrario, a concentraciones más altas, el metiocarb incrementaba su toxicidad (85,9 %), haciéndolo el principal factor de mortalidad y el sinergismo del acrinatrín quedaba en segundo plano.

4. CONCLUSIONES

Los datos presentes indican que los sinergistas de carbamatos podrían ser usados para restaurar alguna susceptibilidad a los piretroides en *F. occidentalis*. La aplicación a baja dosis de carbamatos mezcladas con acrinatrín permitirá a los agricultores alcanzar los beneficios de una estrategia anti-resistencia a un precio y a una tasa de entrada de insecticidas en el medio ambiente reducidos. Estos resultados pueden tener una aplicación práctica considerable para la gestión de la resistencia de *F. occidentalis*.

5. REFERENCIAS

- [1] Contreras, J., Moreno, D., Hernández, MD., Bielza, P., Lacasa, A. (2001). Preliminary study on insecticide resistance in *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) in sweet pepper crops in Campo de Cartagena (Murcia), S.E. of Spain. *Acta Hort.* 559, 745-752.
- [2] Espinosa, PJ., Contreras, J., Quinto, V., Grávalos, C., Fernández, E., Bielza, P. (2005) Metabolic mechanisms of insecticide resistance in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Pest Manag. Sci.* 61, 1009-1015.
- [3] Espinosa, PJ., Bielza, P., Contreras, J., Lacasa, A. (2002). Insecticide resistance in field populations of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) in Murcia (south-east Spain). *Pest Manag. Sci.* 58, 967-971.
- [4] Espinosa, PJ., Bielza, P., Contreras, J., Lacasa, A. (2002). Field and laboratory selection of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) for resistance to insecticides. *Pest Manag. Sci.* 58, 920-927.
- [5] Espinosa, PJ., Fuentes, JF., Contreras, J., Bielza, P., Lacasa, A. (2002). Método de cría en masa de *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Boletín de Sanidad Vegetal: Plagas* 28, 385-390.
- [6] Lacasa, A., Contreras, J. (1993). Comportamiento de *Frankliniella occidentalis* en la transmisión del virus del bronceado del tomate: planteamientos para su control en cultivos hortícolas. *Phytoma España* 50, 33-39.

Tabla 1: Pendientes, concentraciones letales (CL), factores de resistencia (FR) y ratios de sinergismo (RS) de diferentes insecticidas, con y sin sinergistas, contra poblaciones susceptibles (MLFOM), y poblaciones seleccionadas resistentes a insecticidas (MET9, ACR9 y FOR7) de *Frankliniella occidentalis*.

Población	Tratamiento	Pendiente (±SE)	CL ₅₀ (mg L ⁻¹) (95% FL)	FR ₅₀	RS ₅₀	CL ₉₀ (mg L ⁻¹) (95% FL)	FR ₉₀	RS ₉₀
MLFOM	Metiocarb	2,08 (±0,29)	20 (15 - 25)	1,0	-	82 (57 - 140)	1,0	-
	Acrinatrín	1,00 (±0,18)	9 (4 - 15)	1,0	-	176 (82 - 967)	1,0	-
FOR7	Formetanato	3,20 (±0,43)	960 (792 - 1143)	1,0	-	2417 (1918 - 3437)	1,0	-
	Metiocarb	1,34 (±0,30)	218 (146 - 363)	11,0	-	1981 (882 - 13763)	24,1	-
	Acrinatrín	1,18 (±0,21)	170 (45 - 416)	18,8	-	2075 (685 - 376350)	11,8	-
	Formetanato	1,26 (±0,15)	12873 (6780 - 33562)	13,4	-	300000 ^a	124,1	-
	Formetanato + clorpirifos	1,23 (±0,21)	5111 (2690 - 10498)	5,3	2,5	56007 (22135 - 443530)	23,2	5,4
	Formetanato + metiocarb	1,96 (±0,30)	2625 (1654 - 4075)	2,7	4,9	11854 (6969 - 31026)	4,9	25,3
	Formetanato + acrinatrín	1,35 (±0,29)	2835 (813 - 5749)	3,0	4,5	25348 (11309 - 199350)	10,5	11,8
MET9	Acrinatrín	1,15 (±0,22)	222 (69 - 579)	24,6	-	2866 (914 - 264520)	16,3	-
	Metiocarb	2,11 (±0,27)	129 (95 - 174)	6,5	-	525 (354 - 1001)	6,4	-
	Metiocarb + clorpirifos	2,63 (±0,49)	49 (19 - 76)	2,4	2,7	149 (93 - 595)	1,8	3,5
	Metiocarb + acrinatrín	0,83 (±0,15)	8 (4 - 16)	0,4	15,4	293 (121 - 1490)	3,6	1,8
ACR9	Metiocarb	2,51 (±0,36)	135 (92 - 178)	6,8	-	436 (307 - 848)	5,3	-
	Acrinatrín	1,14 (±0,14)	9325 (4949 - 17383)	1029,6	-	124740 (55514 - 492580)	710,7	-
	Acrinatrín + clorpirifos	0,31 (±0,08)	11279 (3024 - 91294)	1245,3	0,8	B	-	-
	Acrinatrín + metiocarb	1,22 (±0,16)	5 (3 - 9)	0,6	1772,1	59 (31 - 159)	0,3	2103,3

^a Los límites fiduciales están fueran de rango.

^b No se ajusta al modelo probit.

Combined effects of deficit irrigation and crop level on early nectarine trees

Efecto combinado del déficit hídrico y la carga frutal en nectarino extratemprano

J.M. de la Rosa^{*1}, MR. Conesa¹, R. Domingo¹, E. Aguayo², N. Falagán², A. Pérez-Pastor¹

¹ Departamento de Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). Paseo Alfonso XIII, 48. ETSIA. 30203. Cartagena (Murcia). Spain.

² Departamento de Ingeniería de Alimentos. Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). Paseo Alfonso XIII, 48. ETSIA. 30203. Cartagena (Murcia). Spain.

Abstract

A three-year long experiment was implemented in an early nectarine (*Prunus persica* L. Batsch cv. Flanoba) commercial orchard to evaluate the effects of deficit irrigation and different crop levels on vegetative growth, plant water status, and fruit yield and quality. Three irrigation treatments were assessed: (i) control, full irrigation (T_{CTL}); (ii) normal practice of the farmer (T_{FRM}); and (iii) regulated deficit irrigation (T_{RDI}), which involved irrigating the crop at the same level as the control (T_{CTL}) during the critical periods of the first year and at 60% T_{CTL} during postharvest. Besides, during the last two seasons, the interactions between T_{CTL} and T_{RDI} were studied at five different crop levels. Crop water use efficiency (WUE) of T_{RDI} was higher than in T_{CTL} and T_{FRM} , increasing by around 25% in 2010 and 2011, and around 74% the final year. Interestingly, T_{FRM} increased the WUE from the first year by more than 30%. Vegetative growth was clearly sensitive to deficit irrigation with a strong correlation between the increase in the water stress integral obtained by midday stem water potential (Ψ_{stem}) and the reduction in TSCA. In contrast, fruit production and quality were not affected by water deficit.

Keywords: RDI; signal intensity; trunk growth; water stress integral; yield.

Resumen

Se realizó un experimento durante tres años en una finca comercial de nectarinos extratempranos (*Prunus persica* L. Batsch cv. Flanoba) a fin de evaluar el efecto del déficit hídrico y la carga productiva en el crecimiento vegetativo, el estado hídrico de la planta y la calidad y cantidad de la cosecha. Se manejaron tres tratamientos de riego: (i) control, bien regado (T_{CTL}); (ii) Práctica habitual del agricultor (T_{FINC}); y (iii) Riego deficitario controlado (T_{RDC}), que se regó como T_{CTL} durante los periodos críticos y al 60 % de T_{CTL} en la poscosecha. Además, se estudió la interacción entre T_{CTL} y T_{RDC} en cinco niveles diferentes de carga productiva. La eficiencia en el uso del agua (EUA) en T_{RDC} fue más alta que en T_{CTL} y T_{FINC} , incrementándose alrededor de un 25 % en 2010 y 2011 y un 74% en el último año. Interesantemente T_{FINC} incrementó la WUE desde el primer año en más de un 30%. El crecimiento vegetativo fue sensible a déficit hídrico presentando una fuerte correlación el estrés. En contra, la producción y calidad de los frutos no se vio afectada por el déficit hídrico.

Palabras clave: RDC; intensidad de señal; crecimiento de tronco; integral de estrés hídrico; producción.

* E-mail: josemdlrs@hotmail.com

1. INTRODUCCIÓN

Todo incremento de la población mundial ocasiona un aumento en la demanda de alimentos, que suele ir acompañada, sobre todo en ciertos mercados, de una mayor exigencia en la calidad del producto ofertado. Un buen manejo del riego es una herramienta que puede incidir en la cantidad y calidad de los frutos cosechados [1]. Considerando que el agua es un recurso limitado y en ocasiones de elevado coste es necesario incrementar la eficiencia en su uso. En este sentido, el riego deficitario controlado (RDC, [2]), es una estrategia de riego tendente a optimizar este uso, reduciendo los aportes hídricos en aquellos momentos fenológicos en los que no se afecte a la producción ni a la calidad del fruto cosechado, cubriéndose las necesidades hídricas del cultivo durante el resto del año. Por otra parte, la utilización de los indicadores del estado hídrico para la programación del riego deficitario disminuye el riesgo que supone regar al cultivo por debajo de sus necesidades hídricas totales. Entre estos indicadores, la máxima contracción diaria de diámetro de tronco (MCD) ha presentado alta sensibilidad en diferentes cultivos y tiene la ventaja de su medida continua fácilmente automatizable.

Por todo ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del riego deficitario controlado y la carga frutal en el crecimiento vegetativo, en la producción y en la calidad de la cosecha de nectarinos extratempranos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Sitio experimental

El estudio se realizó durante 3 ciclos de cultivo (2009/12), en una explotación comercial de nectarinos extra-tempranos (*Prunus persicae* L. Batsch cv Flanoba) injertados sobre pie híbrido GF677 y ubicada en Molina de Segura (Murcia, 38° 8' N; 1° 13' W). Los árboles tenían 7 años de edad al inicio del ensayo y estaban dispuestos a un marco de plantación de 5.5 x 3.5 m.

2.2 Tratamientos de riego

Se realizaron tres tratamientos de riego: (i) control, regado para satisfacer las necesidades hídricas totales del cultivo (T_{CTL}); (ii) Práctica habitual del agricultor (T_{FINC}); y (iii) riego deficitario controlado (T_{RDC}), que se regó como T_{CTL} durante los periodos críticos y al 60 % de T_{CTL} en la poscosecha del primer año. En los siguientes dos años el riego se programó para mantener la intensidad de señal (SI) de la máxima contracción diaria de tronco ($ISMCD = MCD_{T_{RDC}}/MCD_{T_{CTL}}$) con diferentes niveles de estrés hídrico dependiendo del estado fenológico: SI=1.0 (sin estrés hídrico) y SI=1.4 (estrés hídrico moderado).

Además, en los dos últimos años, se estudió el efecto del déficit hídrico en cinco niveles de carga productiva: i) muy baja (16 cm entre frutos); baja (14 cm entre frutos); normal (12 cm entre frutos); alta (10 cm entre frutos) y muy alta (8 cm entre frutos).

Cada tratamiento de riego estaba compuesto por 3 repeticiones distribuidas según un esquema de bloques al azar. Las repeticiones estaban formadas por tres filas de 15 árboles cada una de ellas. Las medidas se realizaban en la fila central. Los tratamientos de carga productiva estaban compuestos por 3 repeticiones de 3 árboles por tratamiento.

2.3 Medidas realizadas

La fluctuación del diámetro de tronco (FDT) se midió con 6 sensores LVDT (Solartron Metrology, Bognor Regis, UK, model DF \pm 2.5 mm, precisión \pm 10 μ m) por tratamiento. A partir de dicha fluctuación se determinó la máxima contracción diaria del tronco (MCD), como diferencia del máximo diámetro tronco que tiene lugar a primera hora de la mañana (MXDT) y mínimo diámetro de tronco que ocurre por la tarde (MNDT) y la tasa de crecimiento diario de tronco (TCD),

calculada por diferencia de los valores de MXDT de dos días consecutivos. El crecimiento vegetativo se determinó a partir de medidas del peso seco de la madera extraída en las podas y medidas puntuales de diámetros de troncos y longitud de brotes.

El crecimiento del fruto se determinó con medidas semanales de diámetro ecuatorial y peso fresco. Se cuantificó la producción en cada tratamiento a partir del peso y número de frutos de la cosecha. El peso medio del fruto se determinó relacionando el peso de la cosecha con el número de frutos de cada árbol. Se recogieron muestras representativas de cada corte para analizar en laboratorio los principales parámetros de calidad física (firmeza y diámetro) y química (acidez, contenido de sólidos solubles totales e índice de madurez).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El riego aplicado en T_{CTL} promedió $6720 \text{ m}^3 \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{año}^{-1}$ y presentó pequeñas variaciones entre años debido a las diferentes condiciones climáticas. La aplicación anual de riego en T_{RDC} fue disminuyendo conforme avanzaban los ciclos de estudio hasta alcanzar una dotación mínima en el tercer ciclo de $4520 \text{ m}^3 \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{año}^{-1}$. Igualmente, T_{FINC} fue reduciendo la dotación de riego año tras año (8170 , 6540 y $6480 \text{ m}^3 \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{año}^{-1}$ para los ciclos 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012, respectivamente), en este caso el agricultor estaba influenciado por los buenos resultados conseguidos en T_{RDC} .

Los troncos de los nectarinos regados bajo condiciones no limitantes de agua experimentaron un crecimiento anual de diámetro de tronco en torno a $10 \text{ mm} \cdot \text{año}^{-1}$. Como era de esperar, T_{RDC} redujo el crecimiento del tronco, aproximadamente un 40 % respecto a T_{CTL} . Esta pauta se repitió, con pocas diferencias, en los tres años de estudio (datos no mostrados). Los troncos de T_{RDC} , a pesar de su menor crecimiento, no presentaron secciones transversales significativamente menores a las de T_{CTL} hasta el tercer ciclo (datos no mostrados). En cambio, T_{FINC} tuvo un comportamiento desigual a lo largo del experimento, ya que en los dos primeros ciclos experimentó un crecimiento similar a T_{CTL} mientras que en el tercer año T_{FINC} redujo en un 35% el crecimiento del tronco (datos no mostrados). Esto es debido a que el agricultor, motivado por los buenos resultados obtenidos en T_{RDC} , decidió reducir los aportes de agua durante el tercer ciclo.

El peso seco de la madera extraída en las podas en T_{RDC} era inferior a T_{CTL} desde octubre del primer año, pero las diferencias sólo fueron significativas al final del ensayo. T_{FINC} no presentó en ningún caso pesos de poda significativamente diferentes a los de T_{CTL} . La longitud de los brotes no presentó diferencias significativas entre tratamientos en ningún momento (datos no mostrados).

La evolución del crecimiento de fruto, tanto en diámetro ecuatorial como en peso fresco, no presentó diferencias significativas entre tratamientos de riego. Los operarios recolectaban la fruta en diferentes cortes (entre 4 y 6 cortes por temporada) seleccionando las nectarinas por color y tamaño. Los diferentes tratamientos de riego no han afectado a la precocidad de la maduración de la fruta, ya que la producción recolectada en cada corte no difiere significativamente entre tratamientos. Los parámetros productivos (peso de fruta recolectada, número de frutos y peso medio del fruto) no han presentado diferencias significativas entre tratamientos en ninguno de los cortes realizados ni en el total de las cosechas. La misma producción con menor cantidad de agua aplicada en T_{RDC} generó un incremento promedio de los tres años en la eficiencias en el uso del agua de riego del 40 % para dicho tratamiento (datos no mostrados).

Los parámetros de calidad estudiados (diámetro ecuatorial, sólidos solubles totales, acidez, índice de madurez y firmeza) no presentaron diferencias significativas entre tratamientos de riego.

Incrementos en la carga productiva promovieron incrementos en la producción. En cambio, todos los parámetros de calidad estudiados (tamaño, firmeza, sólidos solubles totales y acidez) aumentaban su valor cuando disminuía el número de frutos por árbol, encontrándose relaciones lineales con altos coeficientes de determinación. El riego deficitario no afectó a los parámetros productivos y de calidad en ninguno de los niveles de carga productiva estudiados.

4. CONCLUSIONES

El tratamiento de riego deficitario controlado (T_{RDC}), con una reducción de agua promedio anual del 24 % ($1600 \text{ m}^3 \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{año}^{-1}$) no ha generado mermas ni en la cantidad ni en la calidad de la cosecha y ha mejorado en un 40 % la eficiencia en el uso del agua de riego. Por lo tanto, esta estrategia de riego es recomendable en cualquier situación, pero más aún en las regiones donde la escasez de agua es sufrida por los agricultores con precios muy elevados y bajas dotaciones hídricas.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por ministerio español de ciencia e innovación (AGL2010-19201-C04-04) y por el proyecto europeo LIFE+ IRRIMAN (LIFE13 ENV/ES/000539).

6. REFERENCIAS

- [1] Fereres, E., Soriano, M.A. (2007). Deficit irrigation for reducing agricultural water use. *J. Exp. Bot.* 58, 147-159.
- [2] Mitchell, P.D., Jeire, P.H., Chalmers, D.J. (1984). Effects of regulated water deficits on pear tree growth, flowering, fruit growth and yields. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 109, 604-606.

Orius laevigatus (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) microbial community and its involvement in non-prey feeding tolerance.

Caracterización simbiogénica de *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) y sus implicaciones en la tolerancia a la alimentación sin presa.

J.E. Mendoza^{*1}, V. Balanza¹, X. Chen², M. D. Hitchings², P. D. Facey², R. del Sol², P. Bielza¹

¹Departamento de Producción Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT), Paseo Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Spain.

²Institute of Life Science, College of Medicine, Swansea University, SA2 8PP-Swansea, United Kingdom.

Abstract

Orius laevigatus ability to survive under prey-scarce conditions is a key for its long-term settlement in the crop. However, other *Orius* species show a greater tolerance when they are fed on pollen, such as *O. majusculus* and *O. pallidicornis*. Considering an insect microbiome as a crucial aspect of its ecology, some culturable bacteria from various *O. laevigatus* Mediterranean populations and other *Orius* species were isolated on a nutrient-rich medium and sequenced. Two different types of colony were isolated in almost every *O. laevigatus* sample: a small pale colony, identified *in silico* as a Microbacteriaceae; and a large one, white-coloured, related to *Serratia*. Instead, the isolates for other *Orius* species were totally different. A high presence of carbohydrate metabolism-related bacteria in *O. pallidicornis*, as is the case of *Acinetobacter* or *Corynebacterium*, should also be noted. This study will serve to optimize *O. laevigatus* capability to settle in the agrosystem and so improving its efficiency as a biological control agent.

Keywords: pollen; endosymbionts; sequencing; enhanced natural enemies.

Resumen

La capacidad de *Orius laevigatus* para sobrevivir en situaciones de escasez de presas es clave para su establecimiento en el cultivo. Sin embargo, existen especies con una tolerancia más alta a la alimentación a base de polen, como *O. majusculus* y sobre todo *O. pallidicornis*. Además, al constituir la microbiota de un insecto un aspecto fundamental de su ecología, se decidió aislar en medio rico las bacterias cultivables del microbioma de diez poblaciones mediterráneas de *O. laevigatus*, así como las de estas otras especies de *Orius*, secuenciando a continuación su genoma. Prácticamente en todas las poblaciones de *O. laevigatus* se observaron dos tipos de colonias: unas de pequeño tamaño, identificadas *in silico* como una Microbacteriaceae; y otras más grandes, próximas a *Serratia*. En cambio, las bacterias aisladas para las otras dos especies de *Orius* fueron muy diferentes. Cabe destacar la presencia en *O. pallidicornis* de dos colonias identificadas como dos bacterias implicadas en el metabolismo de carbohidratos: *Acinetobacter* y *Corynebacterium*. Este estudio servirá de base para optimizar la capacidad de *O. laevigatus* para establecerse en el cultivo a largo plazo, incrementando su eficacia como agente de control biológico.

Palabras clave: polen; endosimbiontes; secuenciación; mejora de enemigos naturales.

* E-mail: enrique.menriv@gmail.com

1. INTRODUCCIÓN

Normalmente, los agricultores manejan sus cultivos con la intención de conseguir una producción eficiente, sin prestar mucha atención a las necesidades de los insectos que atacan a las plagas. Sin embargo, es muy frecuente que los cultivos constituyan ambientes desfavorables para algunos enemigos naturales, como es el caso de *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae). Este depredador, muy común en la cuenca Mediterránea y el norte de Europa [1], presenta una gran eficacia en el control de *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) [2], pero su fecundidad se reduce drásticamente cuando se realiza una liberación temprana en el invernadero, a pesar de su capacidad para sobrevivir alimentándose del polen de las flores del cultivo [3]. Por lo tanto, mejorar la fecundidad del insecto en estas condiciones permitiría su liberación en el cultivo en una fase en la que la plaga aún no se haya extendido.

Para ello, este artículo ahonda en el hecho de que hay otras especies de *Orius* con mayor tolerancia al polen, como *O. majusculus* (Reuter) y sobre todo *O. pallidicornis* (Reuter), que basa su dieta en el polen de *Ecballium elaterium* (L.) (Richard) (Cucurbitales: Cucurbitaceae) [4-5]. Además, al existir una clara relación entre la dieta de un insecto y la flora que alberga su sistema digestivo [6-7], el objeto de este estudio consistió en caracterizar simbiogenéticamente una serie de poblaciones mediterráneas de *O. laevigatus*, *O. pallidicornis* y *O. majusculus* mediante el aislamiento y la secuenciación de las bacterias cultivables, con el fin de hallar algún patrón que nos permita dilucidar las implicaciones del microbioma en el éxito de la tolerancia al polen.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Recolección de las poblaciones de *Orius*.

El material biológico para este estudio se obtuvo de la cría artificial de insectos a partir de poblaciones silvestres recolectadas en distintas áreas de clima mediterráneo. El mantenimiento y la multiplicación, a 26 °C y con fotoperiodo 16:8 (L:O), se realizaron en la Finca Experimental Tomás Ferro de La Palma (Cartagena, Murcia). Para *O. laevigatus*, se estudiaron las poblaciones Samaria (Grecia), Cazorla (Jaén), Hellín (Albacete), Policoro y Acate (ambas en Italia), Portonovo (Pontevedra), Cabrils (Barcelona), Cabo de Gata (Almería), Carmona (Sevilla) y Ruidera (Ciudad Real); la población de *O. pallidicornis* se recolectó en Cartagena, y la de *O. majusculus* fue cedida por el Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) de Cabrils (Barcelona).

2.2 Aislamiento, secuenciación e identificación *in silico* de las bacterias cultivables.

Cinco adultos de cada población se congelaron a -20 °C y se enviaron al Institute of Life Science de la Swansea University (Reino Unido), donde se esterilizaron externamente mediante un protocolo ya publicado [8], se trituraron y homogeneizaron en tampón 1xTE, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en agar nutritivo, incubando a 30 °C durante toda la noche. Los distintos tipos de colonias se aislaron según su morfología en caldo nutritivo, extrayendo a continuación el ADN bacteriano mediante el QIAmp Mini Kit (Qiagen®) para su secuenciación mediante la tecnología Illumina®. Las secuencias obtenidas se procesaron para eliminar los fragmentos de baja calidad (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) y se ensamblaron, usando Velvet [9], en borradores genómicos. Finalmente, éstos fueron anotados en la plataforma online RAST [10] y comparados con la base de datos de secuencias de referencia de AmphoraVisu [11] y del propio RAST (SEED), las cuales devuelven el filotipo más probable para cada secuencia.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como puede observarse en la Tabla 1, en nueve de las diez poblaciones ensayadas de *Orius laevigatus* se consiguió aislar una colonia grande y blanquecina que se identificó en AmphoraVisu como una bacteria próxima al género *Serratia*, según ambas bases de datos. Esta bacteria aparece también en *O. majusculus* y *O. pallidicornis*. Se trata de una enterobacteria tan común en los insectos que su especie más representativa es *S. entomophila*, que en 1978 [12] se consiguió aislar en más de 30 especies. Por otro lado, en siete de las diez poblaciones de *O. laevigatus* se aisló con éxito una colonia más pequeña y de un color pálido, identificada como una microbacteriácea cercana a *Microbacterium testaceum* o *Clavibacter michiganensis*, y que no se observó en ninguna

muestra de las demás especies de *Orius*. Es importante resaltar también que en la población de Portonovo se aisló *Erwinia*, una bacteria representativa de *F. occidentalis* [8].

De entre las colonias aisladas en las muestras de *O. majusculus* y *O. pallidicornis*, destacan en esta última dos bacterias implicadas en distintas etapas de la degradación de carbohidratos, principales componentes del polen del que se alimenta este insecto de forma exclusiva. Una de ellas, identificada como *Acinetobacter* y que da lugar a colonias verdosas de forma irregular y de consistencia cremosa, fue la principal bacteria aislada en el néctar y el polen de numerosas plantas silvestres del sur de la Península Ibérica [13]; la otra, *Corynebacterium*, forma colonias más pequeñas, grisáceas y de aspecto granuloso, y es capaz de sintetizar aminoácidos a partir de glucosa, fructosa y sacarosa [14]. Ninguna de ellas se observó en *O. majusculus* ni *O. laevigatus*.

4. CONCLUSIONES

A la luz de los resultados obtenidos en este estudio, y sin dejar de resaltar la intención de seguir profundizando en el estudio de las comunidades que componen la flora de estos insectos (no sólo las bacterias cultivables), se confirma una vez más la estrecha relación interespecífica existente entre microbioma y hospedador. Asimismo, nuevos estudios encaminados a dilucidar los mecanismos que permiten la transferencia vertical y horizontal de simbiontes sentarían las bases para su aplicación en la mejora de la tolerancia de *Orius laevigatus* a la alimentación a base de polen, incrementando la eficacia de este enemigo natural en situaciones de escasez de presas.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la UPCT la concesión de una beca de movilidad al autor principal de esta investigación, sin la cual ésta no habría sido posible; a E. Martínez-Díaz, por su inestimable ayuda técnica; y al IRTA, por su generosidad en la cesión de poblaciones de insectos.

6. REFERENCIAS

- [1] Péricart, J. (1972). Hémiptères. Anthocoridae, Cimicidae et Microphysidae de l'Ouest- Paléartique. Masson et Cie. 402 pp.
- [2] 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 U.K. Biocontrol Sci. Techn. 3: 295-307.
- [3] Cocuzza, G. E., De Clercq, P., Lizzio, S., Van de Veire, M., Tirry, L., Degheele, D., Vacante, V. (1996). Reproduction of *Orius laevigatus* and *Orius albidipennis* on pollen and *Ephesia kuehniella* eggs. Entomol. Exp. Appl. 82: 101-104.
- [4] Pumariño, L., Alomar, O. (2012). The role of omnivory in the conservation of predators: *Orius majusculus* (Heteroptera: Anthocoridae) on sweet alyssum. Biolog. Control 62: 24-28.
- [5] Carayon, J., Steffan, J. R. (1959). Observations sur le régime alimentaire des *Orius* et particulièrement d'*Orius pallidicornis* (Reuter) (Heteroptera: Anthocoridae). Cah. Nat. 15: 53-63.
- [6] Dillon, R. J., Dillon, V. M. (2004). The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. Ann. Rev. Entomol. 49: 71-92.
- [7] Douglas, A. E. (2009). The microbial dimension in insect nutritional ecology. Funct. Ecol. 23: 38-47.
- [8] de Vries, E. J., Breeuwer, J. A., Jacobs, G., Mollema, C. (2001). The association of Western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, with a near *Erwinia* species gut bacteria: transient or permanent? J. Invertebr. Pathol. 77: 120-128.
- [9] Zerbino, D. R., Birney, E. (2008). Velvet: algorithms for *de novo* short read assembly using de Bruijn graphs. Genome Res. 18: 821-829.
- [10] Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M., Vonstein, V., Wattam, A. R., Xia, F., Stevens, R. (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). Nucleic Acids Res, 42: 206-214.
- [11] Kerepesi, C., Bánky, D., Grolmusz, V. (2014). Amphora Net: The webserver implementation of the AMPHORA2 metagenomic workflow suite. Gene 533 (2): 538-540.
- [12] Grimont, P. A. D., Grimont, F. (1978). The genus *Serratia*. Annu. Rev. Microbiol. 32: 221-248.
- [13] Álvarez-Pérez S., Herrera C. M. (2013). Composition, richness and nonrandom assembly of culturable bacterial-microfungal communities in floral nectar of Mediterranean plants. FEMS Microbiol. Ecol. 83: 685-699.
- [14] Georgi, T., Rittmann, D., Wendisch, V.F. (2005). Lysine and glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* on glucose, fructose and sucrose: roles of malic enzyme and fructose-1,6-bisphosphatase. Metab. Eng. 7(4): 291-301.

Tabla 1. Colonias aisladas para las distintas muestras de *Orius* y resultado de su identificación *in silico* en AmphoraVisu y en RAST (el porcentaje y el score mostrados indican, respectivamente, la probabilidad del filotipo asignado y la semejanza con la secuencia de referencia más próxima).

Población	Morfología de la colonia	AmphoraVisu	RAST (secuencia de referencia)
<i>O. majusculus</i>	grande y pálida	Género <i>Pseudomonas</i> (96,8%)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> A506 (Score: 537)
	grande y blanca	Familia Enterobacteriaceae (58,1%)	<i>Serratia marcescens</i> Db11 (Score: 544)
<i>O. pallidicornis</i>	grande y verdosa	Género <i>Acinetobacter</i> (68,8%)	<i>Acinetobacter</i> sp. SH024 (Score: 523)
	grande y pálida	Familia Enterobacteriaceae (58,1%)	<i>Serratia marcescens</i> Db11 (Score: 544)
	pequeña y grisácea	<i>Corynebacterium variabile</i> (74,2%)	<i>Corynebacterium variabile</i> DSM 44702 (Score: 507)
	grande y amarillenta	Género <i>Staphylococcus</i> (35%)	<i>Macrocococcus caseolyticus</i> JCS5402 (Score: 516)
<i>O. laevigatus</i> Samaria	grande y blanca	Género <i>Serratia</i> (32,3%)	<i>Serratia marcescens</i> Db11 (Score: 544)
	pequeña y pálida	<i>Microbacterium testaceum</i> (33,9%)	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> NCPPB 382 (Score: 543)
<i>O. laevigatus</i> Cazorla	grande y blanca	Familia Enterobacteriaceae (61,3%)	<i>Serratia marcescens</i> Db11 (Score: 538)
<i>O. laevigatus</i> Hellín	grande y blanca	Familia Enterobacteriaceae (61,3%)	<i>Serratia marcescens</i> Db11 (Score: 538)
	pequeña y pálida	Familia Microbacteriaceae (58,1%)	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> NCPPB 382 (Score: 538)
<i>O. laevigatus</i> Policoro	grande y blanca	Género <i>Serratia</i> (37,1%)	<i>Serratia marcescens</i> Db11 (Score: 538)
	pequeña y pálida	<i>Microbacterium testaceum</i> (36,2%)	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> NCPPB 382 (Score: 543)
<i>O. laevigatus</i> Acate	grande y blanca	Enterobacteriaceae Family (61,3%)	<i>Serratia marcescens</i> Db11 (Score: 538)
	pequeña y pálida	Microbacteriaceae Family (54,8%)	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> NCPPB 382 (Score: 543)
<i>O. laevigatus</i> Portonovo	grande y blanca	<i>Serratia</i> Genus (37,1%)	<i>Serratia marcescens</i> Db11 (Score: 538)
	pequeña y blanca	Enterobacteriaceae Family (74,2%)	<i>Erwinia tasmaniensis</i> Et1/99 (Score: 518)
<i>O. laevigatus</i> Cabrils	pequeña y pálida	Familia Microbacteriaceae (35,4%)	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> NCPPB 382 (Score: 394)
<i>O. laevigatus</i> Carmona	grande y blanca	Enterobacteriaceae Family (61,3%)	<i>Serratia marcescens</i> Db11 (Score: 538)
<i>O. laevigatus</i> Cabo de Gata	grande y blanca	Enterobacteriaceae Family (61,3%)	<i>Serratia marcescens</i> Db11 (Score: 538)
	pequeña y pálida	Familia Microbacteriaceae (56,3%)	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> NCPPB 382 (Score: 543)
<i>O. laevigatus</i> Ruidera	grande y blanca	Enterobacteriaceae Family (61,3%)	<i>Serratia marcescens</i> Db11 (Score: 538)
	pequeña y pálida	Familia Microbacteriaceae (58,1%)	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> NCPPB 382 (Score: 543)

Phenotypic variability and pathogenicity of different isolates of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* obtained from lemon fruits (*Citrus limon* (L.) Burm.)

Variabilidad fenotípica y patogenicidad de diversos aislados de *Penicillium digitatum* y *P. italicum* obtenidos en frutos de limón (*Citrus limon* (L.) Burm.)

M.A. Parra*, J.A. Martínez

Grupo de Protección de Cultivos. Dpto. Producción Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena, Spain.

Abstract

Citrus rots caused by species of *Penicillium* range from 60 to 80% of the total citrus fruit rots. The objective of this work consisted of collecting several isolates of the two *Penicillium* species from lemons grown in southeast Spain. These experiments consisted of determining mycelial growth curves, conidiation and mass of aerial mycelium of each isolate grown on PDA at 26 °C. *In vivo* experiments were carried out inoculating a drop of an extract of conidia of about 10⁷ conidia/mL with a hypodermal syringe through a puncture reaching the albedo. Lemon fruits inoculated were stored at 15 °C and 75-85% relative humidity, and then incidence and severity of decay were evaluated. Colony and conidiation areas were measured on fruits affected by decay in order to establish the pathogenic characteristics of isolates. Significant differences in growth rates and conidiation were detected among isolates grown in PDA and some differences were identified causing decay in the same way. The most virulent isolate of *P. digitatum* was obtained from Alicante, and from Santomera in the case of *P. italicum*.

Keywords: Green mould rot; blue mould rot; decay; mycelial fungal growth; conidiation pathogen virulence.

Resumen

Las podredumbres de los cítricos causadas por las dos especies de *Penicillium* suponen entre el 60 y 80% del total de las podredumbres en estos frutos. En el presente trabajo se recopilaban varios aislados de las dos especies de *Penicillium* obtenidos a partir de limones cultivados en el sureste de España. Las características fenotípicas medidas fueron las curvas de cinética de crecimiento del micelio, la conidiogénesis y la masa del micelio aéreo creciendo en PDA a 26 °C. Las pruebas de patogenicidad se realizaron tras la inoculación de una suspensión de conidios, del orden de 10⁷ conidios/mL, con una pipeta estéril sobre una herida realizada con un punzón entre el albedo y el flavedo. Los frutos inoculados se almacenaron a 15 °C y 75-85% de humedad relativa y se evaluaron la incidencia y severidad de las podredumbres por medio del tamaño de la podredumbre y el color de ésta que reflejaba la conidiogénesis. Se puso de manifiesto cierta variabilidad fenotípica entre los aislados en relación a la tasa de crecimiento. El aislado más virulento fue el de Alicante para *P. digitatum* y el de Santomera para *P. italicum*.

Palabras clave: Podredumbre verde, podredumbre azul, crecimiento del micelio, conidiogénesis, virulencia del patógeno.

* E-mail: ma.parra@uptc.es

1. INTRODUCCIÓN

Entre los factores que merman la calidad de los productos hortofrutícolas durante su comercialización, destacan las alteraciones patológicas o podredumbres. La aparición de estas patologías son los principales factores de pérdidas económicas, incluso bajo buenas prácticas de almacenamiento, debido a que los patógenos pueden infectar y colonizar fácilmente los productos vivos senescentes por su carácter perecedero [1]. En cítricos, las pérdidas que ocurren durante su almacenamiento y transporte oscilan comúnmente entre el 3 y el 6% [2].

Las especies de *Penicillium* no se caracterizan por su variabilidad entre los individuos de la misma especie, a diferencia de otros hongos como son *Botrytis* o *Fusarium*. Sin embargo, varios estudios demuestran la existencia de esta variabilidad entre individuos de las especies de *Penicillium* [1]. Estas diferencias pueden identificarse estudiando las pautas de crecimiento y, morfología de los aislados, así como su patogenicidad. En este sentido, el objetivo del presente trabajo consistió en comprobar la existencia de variabilidad fenotípica entre distintos aislados de *Penicillium digitatum* y de *P. italicum* obtenidos de podredumbres de frutos de limón cosechados en el sureste de España.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Origen de los aislados y obtención de podredumbres

Se cosecharon frutos de limón de tres procedencias distintas: Beniján (Murcia), Santomera (Murcia) y del sur de la provincia de Alicante. La duración del almacenamiento se alargó lo suficiente hasta obtener de forma natural podredumbres verde y azul ocasionadas por *P. digitatum* y *P. italicum*, respectivamente. Una vez aparecieron y se identificaron estas podredumbres de las tres procedencias, se procedió a aislar a los patógenos en medio de cultivo sintético de agar de patata y dextrosa (PDA). Para ello, se cortó, con la ayuda de un bisturí flameado, una pequeña porción del frente de avance del hongo y se sembró en una placa de Petri que contenía PDA. Esta operación se realizó con los seis aislados, tres de *P. digitatum* y otros tantos de *P. italicum*, incubándolos a 26 °C. Estos cultivos se almacenaron en refrigeración y fueron utilizados posteriormente para estudiar sus características fenotípicas y patogénicas.

2.2 Determinación de características fenotípicas de los aislados

El área de crecimiento de la colonia (cm²) se midió diariamente, previa calibración con el diámetro de la placa Petri, con fotografía digital de ésta y posterior análisis en el software Image Tool for Windows 3.0. La tasa de crecimiento (cm²/día) se midió según el procedimiento descrito en [1] y se calculó entre los días 2 y 8, cuando, de acuerdo con los gráficos obtenidos, no había duda de que el hongo se encontraba en la fase lineal de crecimiento. La duración de la fase lineal (días) se midió como los días transcurridos entre el final de la fase exponencial y el inicio de la fase estacionaria o de deceleración. La masa de micelio (g) se calculó pesando el micelio aéreo que, por otro lado, constituye la mayor parte del micelio de este hongo creciendo en medio de cultivo. La conidiogénesis (conidios/cm²) se calculó utilizando la ecuación descrita en [3].

2.3 Virulencia de los aislados sobre limones

Previo a la inoculación se midió el estado de madurez de los frutos de limón, aplicando el índice de madurez (sólidos solubles * acidez⁻¹) y el índice de color IC, usado habitualmente para identificar la madurez o color del flavedo del limón en procesos de desverdización. La patogenicidad de los aislados se cuantificó aplicando el Índice de Desarrollo de la Podredumbre (IDP) propuesto en [1].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las fases de latencia fueron insignificantes, tanto para *P. digitatum* como para *P. Italicum* (Fig. 1). Los hongos tardaron menos de 24 horas en iniciar su crecimiento. La fase lineal comenzó en todos los aislados a partir del día 2. Sin embargo, entre los días 1 y 2, la tasa de crecimiento fue menor que en la fase lineal, distinguiéndose una fase intermedia entre el fin de la fase de latencia y el inicio de la fase lineal que no ha sido descrita en la literatura. Esto se traduce en que una vez que el hongo despierta de su fase de latencia, su tasa de crecimiento es relativamente lenta hasta alcanzar su fase lineal. Este resultado contradice el hecho de que tras la fase de latencia ocurre la fase exponencial, que dura unas pocas horas, y posteriormente la tasa de crecimiento se ralentiza y se hace constante durante la fase lineal. Esta curva representaría pues una dificultad en el crecimiento del hongo antes de su desarrollo pleno durante la fase lineal.

El resultado anterior podría ser explicado por la dispersión del hongo dentro de la placa de Petri a partir de la germinación de conidios producidos por la propia colonia principal. Este hecho es muy común en *Penicillium*, ya que se trata de un hongo seco y pulverulento, debido a la elevada tasa de conidiogénesis que presenta. Este hecho desemboca en la formación de colonias satélite que podrían interferir en el desarrollo de la colonia principal ralentizando su crecimiento antes de la entrada en fase lineal.

La tasa de crecimiento del aislado de *P. digitatum* de Alicante triplicó la del de Santomera, por lo que creció mucho más rápido que los otros dos aislados (Tabla 1). Sin embargo, los tres aislados de *P. italicum* crecieron más o menos a la misma velocidad, similar a la del aislado de *P. digitatum* de Alicante. Por otro lado, los parámetros CIELAB de color pusieron de manifiesto un color homogéneo de la esporada entre los aislados de la misma especie y diferentes entre las especies, siendo el color de la esporada de *P. italicum* azulada y verde la de *P. digitatum*.

El mayor valor de producción de conidios se obtuvo en el aislado de *Penicillium italicum* de Santomera, mientras que el menor valor se obtuvo para *Penicillium digitatum* de Alicante. Estos resultados, si se comparan con el área final alcanzada por la colonia a los 10 días, no guardan correlación con el recuento de los conidios, por lo que el área de la colonia no determinó la concentración de conidios. En cuanto al micelio aéreo, los valores oscilan para todos los aislados en torno a 3 g.

El valor del índice de color fue aproximadamente -1 este valor indica un tono verde-amarillento del flavedo dirigido hacia tonos mucho más amarillentos que verdosos. Esta indicación coincide con los valores de los parámetros a^* y b^* que indican, respectivamente, un componente verdoso y amarillento de la corteza. La madurez reflejada en el color se correlacionó también con los parámetros químicos de madurez medidos como contenido en sólidos solubles de la pulpa y su acidez.

Los resultados de IDP (no presentados) indicaron variabilidad en la patogenicidad de los aislados y se correlacionó con la tasa de crecimiento del hongo. A mayor tasa, mayor virulencia.

4. CONCLUSIONES

Se ha detectado la presencia de diferencias fenotípicas tanto para *Penicillium digitatum* como para *P. italicum*. Estas diferencias están directamente relacionadas con las características de su crecimiento, por lo que repercuten directamente en la virulencia, muy influenciada por el vigor del patógeno típico en poscosecha, donde se requiere un deterioro de las defensas de los frutos para que se produzca la patogénesis.

5. AGRADECIMIENTOS

A la UPCT por la concesión de una Beca de Iniciación a la Actividad Investigadora. A las empresas S.A.T. Grupo CFM y Limonar de Santomera Sdad. Coop. por el suministro del material vegetal.

6. REFERENCIAS

- [1] Martínez, J.A., González, R. (2012). Control de las podredumbres verde y azul de los cítricos con extractos de aceites esenciales de clavo y canela. *Levante Agrícola. Especial Postcosecha* 441, 202-209.
- [2] Tuset, J. J. (1987). Podredumbres de los Frutos Cítricos (Conselleria D'Agricultura i Pesca, Generalitat Valenciana, Valencia, España).
- [3] Martínez, J.A., González, R. (2013). Essential oils from clove affect growth of *Penicillium* species obtained from lemons. *Comm. Appl. Biol. Sci. Ghent University* 78(3), 563-572.

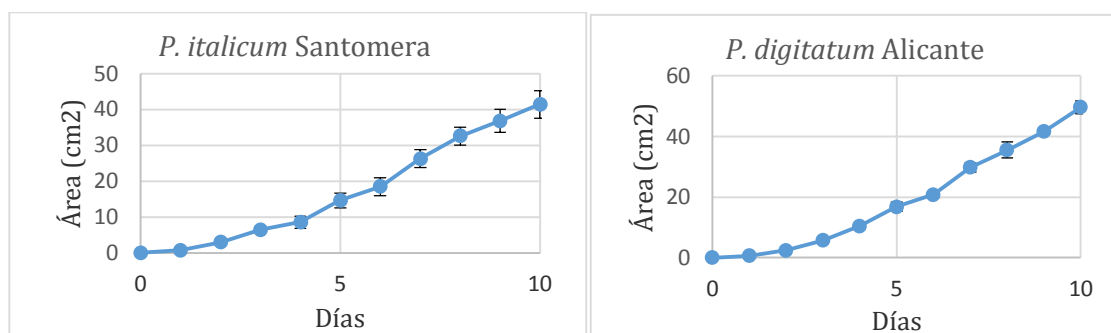


Figura 1. Curvas de cinética de crecimiento de distintos aislados de *Penicillium digitatum* y *P. italicum* obtenidos de podredumbre verde y azul de limón, creciendo en PDA a 26 °C

Tabla 1. Características fenotípicas de diversos aislados de *Penicillium digitatum* y de *P. italicum* obtenidos de podredumbres de limón y creciendo sobre PDA a 26 °C

Aislado	Tasa de crecimiento	Duración de la fase lineal
	(cm ² /día)	(días)
<i>P. digitatum</i> Alicante	6,12	8
<i>P. digitatum</i> Santomera	2,60	8
<i>P. digitatum</i> Beniaján	1,45	8
<i>P. italicum</i> Alicante	5,13	8
<i>P. italicum</i> Santomera	5,09	8
<i>P. italicum</i> Beniaján	4,57	8

Resistance to neonicotinoids in Spanish populations of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae)

Resistencia a neonicotinoides en poblaciones españolas de *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae)

A. Belando*, I. Moreno, C. Grávalos, P. Bielza

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

Abstract

The peach aphid, *Myzus persicae* is a pest of global importance. This species has developed resistance to many chemical classes, including organophosphates, carbamates and pyrethroids. Neonicotinoids are not affected by these mechanisms, and are currently the primary means of control. In 2009 it was found on peach trees in southern France a clone of *Myzus persicae* extremely powerful resistance to neonicotinoids, compromising their effectiveness in the field, being the first example of resistance to neonicotinoid at the point of action found in field populations of any species. To study the presence of this mutation in Spain ten people from different regions were collected. The values obtained vary imidacloprid LC50 2.84 ppm to 944.9 ppm showing a high variability, suggesting that the most resistant populations carry the mutation. The most resistant populations also showed imidacloprid thiamethoxam resistance.

Keywords: Plague; mechanisms; clone.

Resumen

El pulgón del melocotonero, *Myzus persicae*, es una plaga de importancia mundial. Esta especie ha desarrollado resistencia múltiple a muchas clases químicas, incluyendo organofosforados, carbamatos y piretroides. Los neonicotinoides no se ven afectados por estos mecanismos, y son actualmente el principal medio de control. En 2009 se descubrió sobre melocotoneros en el sur de Francia un clon de *Myzus persicae* con resistencia extremadamente potente a los neonicotinoides, comprometiendo su eficacia en campo, siendo el primer ejemplo de resistencia a neonicotinoides en el punto de acción encontrada en poblaciones de campo de cualquier especie. Para estudiar la presencia de esta mutación en España se recolectaron diez poblaciones de diferentes regiones. Los valores obtenidos de LC₅₀ a imidacloprid variaron de 2,84 ppm a 944,9 ppm demostrando una alta variabilidad, sugiriendo que las poblaciones más resistentes portan la mutación. Las poblaciones más resistentes a imidacloprid también mostraron resistencia a tiametoxam.

Palabras clave: Plaga; mecanismos; clon.

1. INTRODUCCIÓN

Myzus persicae es una plaga de importancia mundial de una amplia gama de cultivos, por sus daños directos y por su capacidad de transmitir virus de plantas [1]. Esta especie ha desarrollado resistencia múltiple a muchas clases químicas, incluyendo organofosforados,

* E-mail: ana_belando@hotmail.com

carbamatos y piretroides. El control de *M. persicae* se basa casi exclusivamente en la aplicación de insecticidas y, como resultado, esta especie ha desarrollado resistencia múltiple a muchas clases químicas, incluyendo carbamatos, organofosforados y piretroides [2]. Los mecanismos moleculares de resistencia a los insecticidas en *M. persicae* incluyen la sobreproducción de carboxilesterasas (E4 o FE4) que confiere resistencia principalmente a organofosforados, y dos formas de resistencia en el punto de acción [2]. Una de ellas es una mutación de la proteína de la acetilcolinesterasa (acetilcolinesterasa modificada, MACE por sus siglas en inglés) dando insensibilidad a los dimetil-carbamatos (ej. pirimicarb) [2]. La otra es una mutación del canal de sodio dependiente del voltaje (resistencia knockdown, kdr) dando resistencia a los piretroides. Los neonicotinoides tales como imidacloprid, tiametoxam, tiacloprid, clotianidina y acetamiprid no se ven afectados por estos mecanismos, y actualmente son el principal medio de control.

A pesar del aumento en el uso de los neonicotinoides estos habían demostrado ser invulnerables al desarrollo de resistencias y se habían mantenido muy eficaces contra *M. persicae*, pero en 2009 se descubrió sobre melocotoneros en el sur de Francia un clon de *M. persicae* con resistencia extremadamente potente a los neonicotinoides, comprometiendo su eficacia en campo [3]. La resistencia es conferida tanto por la detoxificación mediada por P450s como por la insensibilidad del punto de acción de los neonicotinoides [3]. Éste es el primer ejemplo de la resistencia a los neonicotinoides en el punto de acción encontrada en poblaciones de campo de cualquier especie [4,5]. La comparación de la secuencia de nucleótidos de seis genes de subunidades del nAChR (Mp α 1-5 y Mp β 1) de clones de pulgones resistentes y susceptibles, reveló un único punto de mutación en la región D del bucle de la subunidad β 1 del nAChR del clon resistente, causando una sustitución de arginina a treonina (R81T) [3].

Debido a las graves consecuencias de esta mutación para el control efectivo de *M. persicae* el objetivo de este trabajo es realizar un seguimiento de su expansión geográfica y estudiar el desarrollo potencial de la resistencia a los neonicotinoides imidacloprid y tiametoxam. Hasta el momento se ha encontrado en Italia, Francia y España.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Poblaciones

Se recogieron 10 poblaciones de *M. persicae* de cultivos frutales de las principales zonas productoras (Lérida, Zaragoza y Murcia) abarcando diferentes escenarios de presión insecticida. Las poblaciones se criaron sobre plantas de pimiento en jaulas.

2.2 Insecticidas

Los neonicotinoides empleados en los bioensayos han sido imidacloprid y tiametoxam.

2.3. Bioensayos

Para los ensayos completos se utilizaron 4-5 concentraciones y un control para cada insecticida y población, tres repeticiones por concentración, y 30 individuos por repetición. Las dosis para cada insecticida se tomaron para un rango de 0-100% de mortalidad.

En hojas de pimiento se realizaron discos (37mm diámetro) que fueron sumergidos durante 10 segundos en la solución acuosa del insecticida a ensayar. Los discos fueron secados al aire y puestos sobre agar (1%) con el envés hacia arriba en la base de cajas de polipropileno. Las cajas son tapadas con su tapa, que están acondicionadas para que puedan transpirar los pulgones y no se mueran por asfixia. Las placas son mantenidas a 25 °C y fotoperiodo de 16:8 h (luz: oscuridad). La mortalidad se estimó a las 24, 48 y 72 horas para ajustar el mejor periodo para cada insecticida, la LC₅₀ se calculó mediante un programa estadístico (POLO PLUS). Se realizaron los bioensayos con adultos ápteros.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de LC₅₀ para imidacloprid variaron de 2,84 ppm a 946,9 ppm demostrando una alta variabilidad (Tabla 1). Las poblaciones JM03, CH01 y AS01 fueron susceptibles, BS, LLEIDA, JRP2, FLIX y JML04 medianamente resistentes y JML06 y JML02 resistentes a imidacloprid.

Se piensa que aquellas poblaciones que presentan una resistencia moderada deben de tener solamente el mecanismo de resistencia metabólico, mientras que las poblaciones resistentes presentan ambos mecanismos de resistencia: metabólico y en el punto de acción. Si este resultado lo comparamos con el de la bibliografía [6] donde el resultado obtenido es de 235 ppm vemos que nuestras poblaciones resistentes presentan valores similares o superiores, lo que sugiere la presencia de la mutación.

Las poblaciones más resistentes a imidacloprid (JML06 y JML02) también mostraron resistencia a tiametoxam (Tabla 2). Sin embargo, no hay un patrón claro de resistencia cruzada entre las poblaciones menos resistentes.

4. CONCLUSIONES

Se ha constatado la presencia en España de poblaciones de *M. persicae* altamente resistente a neonicotinoides.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está siendo financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2014-55298-R) y los fondos europeos FEDER. También ha sido financiado parcialmente por IRAC España.

6. REFERENCIAS

- [1] Blackman, RL., Eastop, VF. (2000). Aphids on the world's crops, an identification and information guide. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd.
- [2]. Devonshire, AL., Field, LM., Foster, SP., Moores, GD., Williamson, MS., Blackman, RL, (1998). The evolution of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 353:1677-1684.
- [3] Bass, C., Puinean, A. M., Andrews, M., Cutler, P., Daniels, M., Elias, J., ... & Slater, R. (2011). Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor β subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. BMC Neurosci. 12(1), 51.
- [4]. Puinean, A. M., Denholm, I., Millar, N. S., Nauen, R., Williamson, M. S, (2010). Characterisation of imidacloprid resistance mechanisms in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål (Hemiptera: Delphacidae). Pest Biochem. Physiol. 97:129-132.
- [5]. Wen, Y., Liu, Z., Bao, H., Han, Z, (2009). Imidacloprid resistance and its mechanisms in field populations of brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål in China. Pest Biochem. Physiol. 94:36-42.
- [6] Slater, R., Paul, V. L., Andrews, M., Garbay, M., & Camblin, P. (2012). Identifying the presence of neonicotinoid resistant peach-potato aphid (*Myzus persicae*) in the peach-growing regions of southern France and northern Spain. Pest Manag. Sci. 68(4), 634-638.

Tabla 1. LC₅₀ de poblaciones de *M. persicae* a imidacloprid.

POB	LC₅₀	Límites(Inf-Sup)	FR
JM03	2.86	1.00-5.39	1.0
CH01	2.84	1.04-7.85	1.0
AS01	4.33	0.79-18.96	1.5
BS	37.81	14.94-174.69	13.2
LLEIDA	17.59	2.51-38.80	6.1
JRP2	40.15	12.03-100.1	14.0
FLIX	33.89	9.86-77.67	11.8
JML06	944.9	412.9-7520	330
JML04	45.19	3.54-116.9	15.8
JML02	240.2	161.5-342.8	84.0

POB = Poblaciones

FR= Factor de Resistencia

Tabla 2. LC₅₀ de poblaciones de *M. persicae* a tiametoxam.

POB	LC₅₀	Límites(Inf-Sup)	FR
JM03	3.92	1.52-12.32	1.0
CH01	48.16	21.09-173.6	12.3
AS01	1.79	0.82-3.52	0.5
BS	65.05	15.47-726.0	16.6
LLEIDA	9.02	2.16-46.93	2.3
JRP2	3.93	1.54-7.93	1.0
FLIX	4.92	0.51-11.19	1.3
JML06	257.2	132.57-452.7	65.6
JML04	0.19	0.02-0.53	0.05
JML02	221.3	78.9-689.4	56.45

POB = Poblaciones

FR= Factor de Resistencia

Baseline susceptibility of Mediterranean populations of *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) to cyantraniliprole

Susceptibilidad basal de poblaciones mediterráneas de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) a ciantraniliprol

I. Moreno*, A. Belando, C. Grávalos, P. Bielza

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

Abstract

Cyantraniliprole is a novel anthranilic diamide insecticide and acts on a large number of pests exclusively activating their ryanodine receptors. It is very effective in the fight against whitefly and is considered to have a favorable ecotoxicological profile. The aim of this work was to study the current state of cyantraniliprole resistance in populations of *Trialeurodes vaporariorum* of the Mediterranean basin. Laboratory tests were done to estimate the lethal dose of cyantraniliprole in these field populations. Our results showed the current situation of high susceptibility to cyantraniliprole ($CL_{50} = 0.063 \text{ mg L}^{-1}$), and they were similar to previous studies of cyantraniliprole against *Bemisia tabaci* values described ($CL_{50} = 0.048 \text{ mg L}^{-1}$). Our data showed information about baseline susceptibility of *T. vaporariorum* to cyantraniliprole and they serve as a reference within the program of resistance management.

Keywords: anthranilic diamide; ryanodine; *Bemisia tabaci*.

Resumen

Ciantraniliprol es un nuevo insecticida del grupo de las diamidas antranílicas, que actúa sobre un gran número de plagas activando exclusivamente sus receptores de rianodina. Es muy efectivo en la lucha contra mosca blanca y se considera que tiene un perfil ecotoxicológico favorable. El objetivo de este trabajo fue estudiar el estado actual de la resistencia a ciantraniliprol en poblaciones de *Trialeurodes vaporariorum* de la cuenca mediterránea. Para ello, se realizaron ensayos en laboratorio, para estimar la dosis letal de ciantraniliprol en dichas poblaciones. Nuestros resultados revelaron la situación actual de alta susceptibilidad a ciantraniliprol ($CL_{50} = 0.063 \text{ mg L}^{-1}$), siendo los valores descritos similares a otros estudios previos de ciantraniliprol frente a *Bemisia tabaci* ($CL_{50} = 0.048 \text{ mg L}^{-1}$). Los datos presentados mostraron información sobre la línea base de susceptibilidad de *T. vaporariorum* a ciantraniliprol, y sirven como base dentro del programa de manejo de la resistencia.

Palabras clave: diamidas antranílicas; rianodina; *Bemisia tabaci*.

* E-mail: inma.moreno@upct.es

1. INTRODUCCIÓN

La mosca blanca de los invernaderos, *Trialeurodes vaporariorum* Westwood, es una plaga polífaga, que habita especialmente en zonas templadas del mundo, causando graves daños tanto en frutales, como cultivos hortícolas y ornamentales [1]. Aunque el control biológico de *T. vaporariorum* ha sido un éxito, particularmente en Europa, el control químico sigue siendo una herramienta útil en la gestión integrada de plagas (GIP) [2].

Con el fin de mantener bajo control las poblaciones de mosca blanca y dada la facilidad con que esta plaga desarrolla resistencias, se hace necesario el desarrollo de nuevos compuestos con diferentes modos de acción para ser incorporados en las estrategias de gestión de la resistencia a insecticidas (GRI). Para llevarlo a cabo de modo racional, antes de incorporar un nuevo insecticida hay que llevar a cabo multitud de ensayos, en primer lugar para conocer los niveles de resistencia de las poblaciones de partida, lo que se conoce como susceptibilidad basal, que debe ser tenida en cuenta como referencia para controlar la evolución potencial de la resistencia.

Ciantraniliprol es un nuevo insecticida del grupo de las diamidas antranílicas, con un nuevo modo de acción, que pertenece al grupo 28 de la clasificación que propone el Comité de Acción contra la Resistencia a Insecticidas (IRAC). Este grupo de insecticidas funciona como selector de los canales iónicos que modulan la liberación de calcio. Las moléculas de ciantraniliprol se unen a los receptores de rianodina, causando una liberación incontrolada de calcio y evitando una mayor contracción muscular [3,4]. Ensayos llevados a cabo tanto en campo como en laboratorio [5,6] han mostrado su alta eficacia frente a *Bemisia tabaci* y otras plagas. Según estudios realizados por Cameron et al. [7] este insecticida también actúa reduciendo la alimentación, lo que produce una disminución en la transmisión de virosis.

El objetivo de este trabajo es obtener la susceptibilidad basal en ninfas de poblaciones de campo de *T. vaporariorum* de la cuenca mediterránea, para establecer las bases de un programa de gestión anti-resistencias antes del registro y uso comercial del insecticida.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Poblaciones de campo

Se utilizaron catorce poblaciones de campo de *T. vaporariorum* de la cuenca mediterránea, seis poblaciones de España (ES), cuatro de Grecia (GRE), tres de Italia (ITA) y una de Francia (FR), recogidas entre los años 2012 y 2015.

2.2 Insecticida

Todos los bioensayos se llevaron a cabo con ciantraniliprol (Cyazypyr 20SC; VerimarkTM, DuPont Crop Protection, Newark, DE).

2.3 Bioensayo sistémico

Para estudiar el estado actual de la resistencia a ciantraniliprol en diferentes poblaciones de *T. vaporariorum* se llevaron a cabo bioensayos sistémicos de ninfas. Para ello se utilizaron plántulas de judía con dos hojas verdaderas. A cada una de las hojas se le fijó una caja-pinza con unos 40 adultos en su interior y se mantuvieron durante 24 horas en una jaula de cristal y en condiciones de laboratorio (25 ° C ± 2, 16:8 (L:O) y 60-65% HR), para su oviposición. Tras este periodo de tiempo, se retiraron las cajas-pinza. A continuación, se enumeraron las hojas y se contaron los huevos a la lupa (aproximadamente 60-80 huevos/hoja). Se procedió al tratamiento, cuatro dosis (0,5-0,1-0,05-0,01 ppm) con cyazypyr sistémico y un control.

Las plántulas se depositaron individualmente en frascos de cristal de 30 ml con las soluciones insecticidas, y se dejaron durante 13 días en condiciones de laboratorio para que el insecticida actuara.

Se mantuvo de nuevo en condiciones de laboratorio hasta el momento de la lectura del bioensayo, día 14 desde que se inició, considerando como individuos vivos las ninfas en estadio 2 e individuos muertos los huevos no eclosionados y las ninfas muertas.

2.4 Análisis de datos

Los datos se analizaron utilizando el programa POLO-PC para el análisis probit [8].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestran los valores de CL_{50} obtenidos de todos los bioensayos realizados con ciantraniliprol y con poblaciones de campo de la cuenca mediterránea de *T. vaporariorum*. Puesto que no hay una población sensible de laboratorio, se tomó como población de referencia la más susceptible a ciantraniliprol, en este caso, ES1.

En los datos observados en la Tabla 1, puede apreciarse claramente que la susceptibilidad a ciantraniliprol varía entre las poblaciones de distintos lugares de la cuenca mediterránea. Los valores de CL_{50} varían entre 0,017 mg L⁻¹ (ES1) y 0,194 mg L⁻¹ (GRE4), lo que supone una variabilidad de 11,4 veces entre la menos sensible y la más resistente. De entre todas las poblaciones, ES1, fue la población más susceptible en comparación con el resto de poblaciones ensayadas, pero no se diferencia con cuatro poblaciones de campo (los valores de CL_{50} van de 0,019 a 0,037 mg L⁻¹). GRE4, fue significativamente más tolerante que el resto de poblaciones, pero no se diferencia de ES6, con un valor de CL_{50} de 0,157 mg L⁻¹. Estos datos tienen suficiente consistencia como para agruparlos y obtener un valor compuesto de CL_{50} de 0,063 mg L⁻¹ para *T. vaporariorum*, que será el valor de referencia para futuros estudios de seguimiento de resistencias. También se debe usar esta cifra de susceptibilidad basal para calcular los factores de resistencia de las poblaciones de campo. Los resultados obtenidos para *T. vaporariorum* en este trabajo son similares a los resultados publicados para la otra mosca blanca *Bemisia tabaci* (CL_{50} = 0,048 (0,034-0,063) mg L⁻¹ (95% LC)) [9].

Antes del uso comercial de un nuevo producto, es necesario llevar a cabo estudios sobre el manejo de la resistencia para determinar la variación natural de la tolerancia a ese compuesto. Conocer esta variabilidad es muy importante de cara a no confundirla con verdadera resistencia al nuevo producto tras su introducción comercial. Nuestros ensayos de laboratorio, muestran una respuesta consistente, con una ligera variación (11,4 veces) en la susceptibilidad a ciantraniliprol. La respuesta de las moscas blancas a ciantraniliprol podría estar influenciada por el historial de exposición a insecticidas, sin embargo, ninguna de las poblaciones ensayadas estuvo en contacto con ciantraniliprol en condiciones de campo, por lo que las diferencias observadas en las CL_{50} son atribuibles a la variación natural.

4. CONCLUSIONES

Nuestros resultados documentan la situación actual de alta susceptibilidad a ciantraniliprol en poblaciones de campo de *T. vaporariorum* de la cuenca mediterránea. Estos datos de referencia serán útiles para el seguimiento de cualquier cambio futuro en la susceptibilidad a ciantraniliprol que puedan aparecer dentro de un programa de gestión de la resistencia a insecticidas (GRI) en poblaciones mediterráneas de mosca blanca.

En resumen, ciantraniliprol puede jugar un papel importante en la disminución de la resistencia a insecticidas en *T. vaporariorum* debido a su alta eficacia. A pesar de ello se requiere un alto nivel de vigilancia, puesto que siempre está presente la amenaza del desarrollo de resistencias, que en el caso de insecticidas puede ser muy elevada.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradecer a la financiación del Ministerio español de Economía y Competitividad (MINECO) (AGL2011-25164), a DuPont y a los fondos europeos FEDER.

6. REFERENCIAS

- [1] Byrne, D. N., Bellows, T. S., Parrella, M. P. (1990). Whiteflies in agricultural systems, in Whiteflies: their Bionomics, Pest Status and Management, ed. by Gerling D. Intercept, Andover, UK, p. 227-261.
- [2] Zou, Y.-Q.; Zheng, B.-Z. (1988). The toxicity of some insecticides to greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum* Westw.) and monitoring of resistance. *Acta Phytophylla Sin* 15, 277-281.
- [3] Cordoba, D., Benner, E. A., Sacher, M. D., Rauh, J. J., Sopa, J.S., Lahm, G. P., Selby, T. P., Stevenson, T. M., Flexner, L., Gutteridge, S., Rhoades, D. F., Wu, L., Smith, R. M., Tao, Y. (2006). Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. *Pestic. Biochem. Phys.* 84, 196-214.
- [4] Satelle, D. B., Cordoba, D., Cheek, T. R. (2008). Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals. *Invertebr. Neurosci.* 8, 107-119.
- [5] Li, X., Degain, B. A., Harpold, V. S., Marçon, P. G., Nichols, R. L., Fournier, A. J., Palumbo, J. C., Ellsworth, P. C. (2012). Baseline susceptibilities of B- and Q-biotype *Bemisia tabaci* to anthranilic diamides in Arizona. *Pest Manag. Sci.* 68, 83-91
- [6] Caballero, R., Cyman, S., Schuster, D. J., Portillo, H. E., Slater, R. (2013). Baseline susceptibility of *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B in southern Florida to cyantraniliprole. *Crop Prot.* 44, 104-108.
- [7] Cameron, R., Lang, E. B., Alvarez, J. M. (2014). Use of honeydew production to determine reduction in feeding by *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) adults when exposed to cyantraniliprole and imidacloprid treatments. *J. Econ. Entomol.* 107, 546-550.
- [8] Russell, R. M., Robertson, J. L., Savin, N. E. (1977). POLO – a new computer program for probit analysis. *Bull Entomol. Soc. Am.* 23, 209–213.
- [9] Grávalos, C., Fernández, E., Belando, A., Moreno, I., Ros, C., Bielza, P. (2015). Cross-resistance and baseline susceptibility of Mediterranean strains of *Bemisia tabaci* to cyantraniliprole. *Pest Manag. Sci.* 71, 1030-1036.

Tabla 1. Toxicidad a ciantraniliprol en ninfas de poblaciones de campo de *T. vaporariorum*

Población	CL ₅₀ (mg L ⁻¹) (95% LC)	FR ₅₀
ES1	0,017 (0,009-0,026)	1
ES2	0,019 (0,006-0,036)	1,1
ITA1	0,026 (0,020-0,032)	1,5
ES3	0,031 (0,020-0,045)	1,8
ES4	0,037 (0,019-0,054)	2,2
GRE1	0,045 (0,035-0,060)	2,6
ITA2	0,047 (0,039-0,055)	2,8
GRE2	0,048 (0,028-0,075)	2,8
ES5	0,059 (0,041-0,071)	3,5
GRE3	0,063 (0,037-0,079)	3,7
ITA3	0,070 (0,055-0,086)	4,1
FR1	0,086 (0,065-0,122)	5,1
ES6	0,157 (0,104-0,211)	9,2
GRE4	0,194 (0,143-0,247)	11,4
LÍNEA BASE	0,063 (0,039-0,096)	3,7

Growth and yield of tomato crop under subsurface drip irrigation treated with different Trifluralin doses

Crecimiento y rendimiento de un cultivo de tomate bajo riego localizado subterráneo sometido diferentes dosis de Trifluralina

F.J. Lucas*¹, V. Martínez-Álvarez ¹, M. Valiente²

¹Departamento de Ingeniería de los Alimentos y del Equipamiento Agrícola. Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena, Spain.

²Departamento de Producción Vegetal y Tecnología Agraria, Área de Ingeniería Agroforestal. Universidad de Castilla-La Mancha. Campus Universitario s/n, 02071 Albacete, Spain.

Abstract

The study evaluates the influence of the irrigation system, the soil substrate, the dosage and application of the herbicide trifluralin (TFN) in the growth and yield of tomato crops. This work comprised two differentiated parts. The first compares both systems irrigation, evaluating TFN action and its efficacy preventing from root intrusion. Results showed that SDI with an appropriate dosage of TFN to prevent from root intrusion, yielded higher production than CDI. The second part assessed the implication of different soil substrates, TFN dosage and application method in the yield and growth of tomato crops under SDI. Results suggested that an increasing dose of TFN prevents drippers from root intrusion but reduced crop productivity. This fact was enhanced in soils with low water retention capacity (sand), where the risk of root intrusion was lower, so high doses of TFN had a harmful rather than a beneficial effect on crop production.

Keywords: SDI; Intrusion; Emitter; Substrate; Dosage.

Resumen

El trabajo pretende evaluar el crecimiento y rendimiento de un cultivo de tomate atendiendo al tipo del sistema de riego localizado: subterráneo (SDI) y superficial (CDI), sustrato y dosis y modo de aplicación de Trifluralina (TFN). Este trabajo consta de dos partes: la primera compara ambos sistemas de riego, evaluando la acción de TFN y su eficacia en la prevención de la intrusión radicular. Los resultados mostraron que SDI con una dosis apropiada de TFN generó mayor producción que CDI. La segunda parte evaluó la implicación de diferentes tipos de sustratos, dosis de TFN y método de aplicación de TFN sobre el rendimiento y crecimiento de un cultivo de tomate bajo SDI. Los resultados sugieren que el incremento en la dosis de TFN previene la intrusión radicular pero reduce el potencial productivo del cultivo. Este hecho fue mayor en suelos con baja capacidad de retención de agua y TFN, donde el riesgo de intrusión radicular es reducido, por lo que dosis altas de TFN tiene una acción nociva sobre la producción.

Palabras clave: SDI; intrusión; emisor; sustrato; dosificación.

* E-mail: javier.lucas@agrolucas.es

1. INTRODUCCIÓN

Se define SDI como la aplicación de agua bajo la superficie del suelo mediante emisores con dosis de descarga en el mismo rango que el riego localizado superficial [1]. Actualmente el uso de este sistema se extiende por todo el mundo y está presente en diferentes tipos de cultivos.

Cuando se compara con CDI, SDI genera producciones más altas en experimentos con maíz, patata, tomate, espárrago, etc. Sin embargo, en la mayoría de los cultivos estudiados, no hubo diferencias significativas en términos de rendimiento, aunque sí un claro incremento de la eficiencia en el uso de agua y fertilizantes [2].

El factor limitante en el uso de SDI es el riesgo de obstrucciones y principalmente las debidas a la intrusión radicular. El herbicida TFN es ampliamente utilizado para actuar frente a este problema. Cuando se aplica en la dosis correcta [3], TFN no presenta efecto adverso alguno sobre la producción de plantas. La fijación de TFN por los coloides del suelo y su efecto sobre el alargamiento de la raíz, hacen de este herbicida adecuado para su uso en SDI, empleándose para prevenir la intrusión de raíces.

Este trabajo se realizó en dos fases simultáneas, en una se compararon CDI y SDI atendiendo a diferentes tratamientos y parámetros del cultivo. Y en la segunda fase, el rendimiento del SDI fue analizada según distintas variables: 1) Dosificación y modo de aplicación de TFN, y 2) tipo de sustrato.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Diseño experimental y tratamientos:

La batería de ensayos se realizó bajo un invernadero multitunel de 4 metros de altura protegido por un plástico tricapa de 200 µm de espesor.

El sustrato de cultivo se dispuso en contenedores de poliestireno expandido de 40 L de capacidad en el que se disponían 3 pares de plantas de tomate var. Yanira, con un emisor turbulento cilíndrico de 2,2 L/h para cada par de plantas. El marco de plantación fue de 1,70 m x 0,3 m entre par de plantas por lo que la densidad de plantación fue de 3,92 m². El transplante se realizó el 23 de julio y acabó el 30 de noviembre. La parcela elemental constaba de 10 plantas distribuidas aleatoriamente con 10 repeticiones por tratamiento.

2.2. Material Vegetal. Suelo y sustratos:

La primera parte del ensayo se realizó con un suelo estándar del Campo de Cartagena (Región de Murcia), con una textura arcillosa.

La segunda parte del ensayo se realizó con tres tipos distintos de sustrato: fibra de coco, suelo arenoso y suelo arcilloso para el que se eligió el suelo descrito para la primera parte del ensayo, para simular condiciones que potencien un óptimo desarrollo radicular, condiciones de reducida retención de TFN y de elevada retención de TFN y agua, respectivamente.

2.3. Parámetros bajo estudio:

Los parámetros de estudio para ambas fases del ensayo fueron: número de ramilletes en flor, número de ramilletes cuajadas, altura de la planta, producción total por planta (Kg/planta) y número de frutos por planta. Los tratamientos experimentados aparecen en la Tabla 1.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 SDI vs CDI:

El valor de producción más alto corresponde con T1 en SDI con diferencias significativas con respecto al tratamiento con la dosis de TFN más alta (T2) y con el control sin adición de TFN. Es importante indicar que el tratamiento Control presenta los rendimientos más bajos en las mismas condiciones de cultivo por lo que los datos sugieren que, para este tratamiento, la intrusión radicular limita el potencial de producción en SDI más que un exceso de dosis de TFN (T2) e incluso más que el cultivo convencional sin los beneficios del uso de SDI. Para el resto de parámetros se comprueba la misma dinámica siendo el T1 y T3 los de mayor valor aunque sin diferencias estadísticamente significativas, excepto para el número de frutos por planta donde de nuevo el tratamiento Control es el de menor valor.

3.2. Tipo de sustrato, aplicación y dosis de TFN:

Como era de esperar los tratamientos en fibra de coco presentan los mayores valores para todos los parámetros, debido a su idoneidad para el desarrollo de raíces. A la vista de los resultados, parece claro que una dosis excesiva de TFN (TB y TC) genera una reducción en el rendimiento del cultivo, con un efecto más negativo que el control sin TFN, y por tanto con presencia de raíces. Es importante reseñar que en suelo arenoso la aplicación de TFN no mejoró la producción esto puede ser debido a la combinación del efecto de TFN en un suelo arenoso, posiblemente con menor sensibilidad a la intrusión radicular por lo que la dosis de TFN debería ajustarse a este hecho. En cambio, en suelo arcilloso, donde la intrusión radicular es un problema habitual, la aplicación TFN dio lugar a los mejores resultados que el control no tratado. En el caso de los emisores con la TFN incorporada, sólo mostró mejores resultados que el resto al analizar la altura de la planta.

4. CONCLUSIONES

El SDI muestra mejor comportamiento, sobre todo en producción, que el CDI siempre y cuando se controle la intrusión radicular con la dosis ensayada más baja de TFN (0,05 mg/emisor). El empleo de una dosis mayor resulta contraproducente, debido al efecto herbicida sobre las raíces, provocando un descenso en los rendimientos incluso por debajo del riego localizado superficial.

Este hecho se observa claramente atendiendo a las características del sustrato, así, en suelo arenoso donde la intrusión radicular presenta un riesgo más bajo, la adición de TFN genera un efecto negativo. En cuanto a fibra de coco, que genera un sistema radicular más potente y con una alta actividad microbiológica, el efecto nocivo de la dosis alta de TFN se ve reducido. En suelo arcilloso el efecto de la dosis de TFN tiene una relación directa con la reducción de la producción para la dosis de TFN más elevada aunque este efecto que en el tratamiento donde no se aplicó TFN.

5. AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por el Proyecto de Investigación “Desarrollo técnico y agronómico del riego localizado subterráneo como alternativa para aumentar la eficiencia hídrica en diferentes sistemas agrícolas. 480/02PA” entre la UPCT y Sistema Azud S. A.

6. REFERENCIAS

[1] ASAE. (1996). Standards. 43rd Ed. S526.1. Soil and water terminology. Ed: ASAE. St. Joseph, Michigan.

[2] Phene C.J., Davis K.R., Hutmacher R.B., McCormick R.L. (1990). Water-fertilizer management of processing tomatoes. *Acta Hort.* 277: 137-143.

[3] Gelmini, G. A. (1991). *Agrotóxicos: legislaçaso básica*. Capinas: Fundação Cargill, 1991. v.1, 398 p.

Tabla 1. Identificación de tratamientos para cada fase del experimento

Fase 1	Fase 2
Control: SDI (0 mg TFN/emisor)	Control: SDI (0 mg TFN/emisor)
T1: SDI (0,05 mg TFN/emisor)	TA: SDI (0,05 mg TFN/emisor)
T2: SDI (0,25 mg TFN/emisor)	TB: SDI (0,25 mg TFN/emisor)
T3: CDI	TC: SDI (1,7 mg TFN integrada en el emisor)

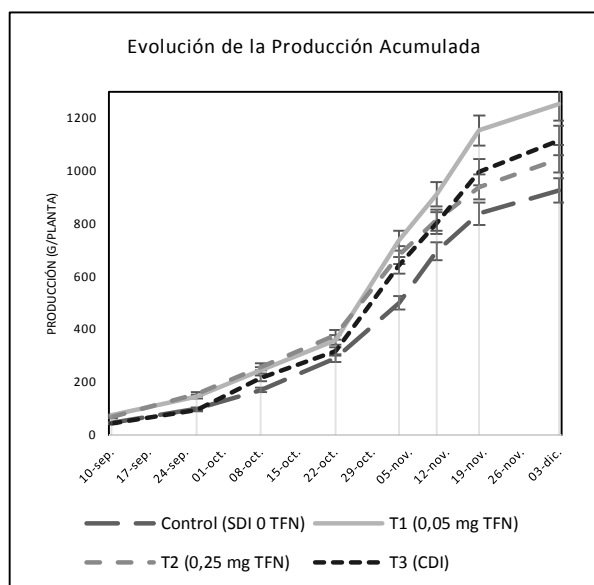


Figura 1. Producción acumulada atendiendo a tipo de riego empleado y manejo de TFN.

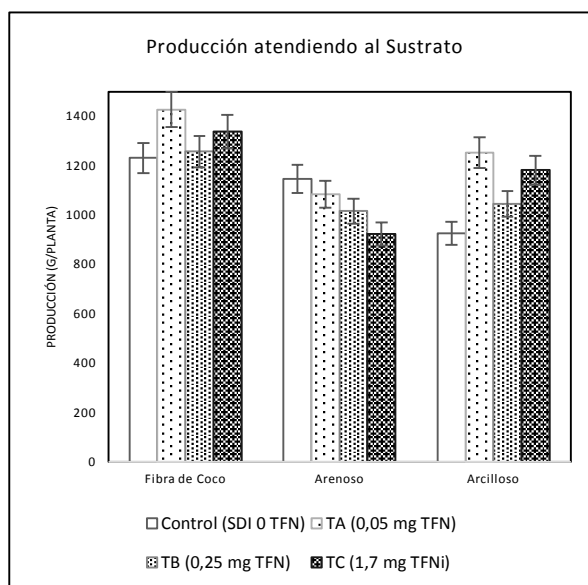


Figura 2. Producción por sustrato y tratamiento de TFN.

Potential resistance to chlorantraniliprole in Mediterranean populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)

Resistencia potencial a clorantraniliprol en poblaciones mediterráneas de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)

L. García-Vidal*, M.R. Martínez-Aguirre, P. Bielza

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

Abstract

The tomato borer, *Tuta absoluta*, is currently one of the most important pests in tomato crops in the world. Chemical control plays a key role in the integrated management of this pest. Chlorantraniliprole is an insecticide belonging to the diamides group, widely used to manage *T. absoluta*, as it is compatible with natural enemies and pollinators. However, cases of resistance development to this insecticide are appearing in some lepidopteran species. In this study, the results of the selection for chlorantraniliprole of two populations of *T. absoluta* are presented, obtaining a resistant population from Sicily, with a LC50 of 147.2 ppm and another from Murcia, with a LC50 of 29.1 ppm.

Keywords: Tomato borer; rynaxypyr; diamide.

Resumen

La polilla del tomate, *Tuta absoluta*, es en la actualidad una de las plagas más importantes a nivel mundial en el cultivo del tomate. El control químico tiene un papel fundamental en la gestión integrada de esta plaga. Clorantraniliprol es un insecticida perteneciente al grupo de las diamidas, muy empleado para el control de *T. absoluta*, ya que es compatible con los enemigos naturales y polinizadores. Sin embargo, están apareciendo casos de desarrollo de resistencia a este insecticida en algunas especies de lepidópteros. En este trabajo, se exponen los resultados obtenidos de la selección de dos poblaciones de *T. absoluta* a clorantraniliprol, obteniendo una población resistente de Sicilia, con CL50 de 147,2 ppm y otra de Murcia, con una CL50 de 29,1 ppm.

Palabras clave: Polilla del tomate; rynaxypyr; diamida.

* E-mail: lidiaGV_ct@hotmail.com

1. INTRODUCCIÓN

La polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick), es una de las plagas más importantes en el cultivo de tomate a nivel mundial, por su rápida expansión y distribución geográfica [1]. Es una plaga nativa de Sudamérica, y fue detectada en España por primera vez en 2006 [2].

El insecticida clorantraniliprol pertenece al grupo de las diamidas, un nuevo grupo de insecticidas clasificados como moduladores del receptor de la rianodina [3]. En la actualidad, clorantraniliprol es ampliamente utilizado para el control de diferentes plagas agrícolas, entre ellas *T. absoluta*. Sin embargo, en los últimos años están apareciendo casos de desarrollo de resistencia a este insecticida en algunas especies de lepidópteros, como en *Spodoptera litura* [4], *Plutella xylostella* [5,6], y también en poblaciones italianas de *T. absoluta* [7].

El objetivo de este trabajo es obtener poblaciones de *T. absoluta* resistentes al insecticida clorantraniliprol, para así estudiar los mecanismos de resistencia implicados y las resistencias cruzadas con otros insecticidas empleados para el control químico de *T. absoluta*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Poblaciones de *T. absoluta*

Las poblaciones de *T. absoluta* empleadas en este estudio fueron dos, una procedente de la región de Murcia, España, recolectada en noviembre de 2014, llamada Calnegre; y la otra población, llamada Sicilia, fue recolectada en diciembre de 2014 en la región de Sicilia, Italia. Ambas poblaciones fueron recolectadas en invernaderos de tomate. En el laboratorio, las poblaciones se mantienen en jaulas de cría con planta de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv. Bobcat) para su alimentación, en condiciones controladas de temperatura (25 ± 2 °C), humedad relativa ($60\pm 5\%$) y fotoperiodo (16/8 h luz/oscuridad).

2.2 Insecticida

El insecticida empleado en este trabajo fue clorantraniliprol, cuya formulación comercial es: Altacor 35WG (rynaxypyr) 35% p/p, de la empresa DuPont.

2.3 Bioensayos de susceptibilidad

Estos bioensayos se realizaron con larvas de segundo estadio (L2) de *T. absoluta*.

El método de inmersión de hojas de tomate fue empleado para la realización de los bioensayos [8]. Se utilizaron distintas concentraciones del insecticida y un control. Se cortaron hojas de tomate, se sumergieron en las distintas concentraciones y se pusieron a secar. Cada hoja se colocó en una caja transparente (dimensiones 12x10x5 cm) y las larvas L2 se colocaron encima de las hojas. Los bioensayos se realizaron con 3 repeticiones por concentración y 10 larvas por repetición, con un total de 30 larvas por concentración de insecticida. La mortalidad se evaluó tras 72 horas.

2.4 Bioensayos de selección de resistencias

Para los bioensayos de selección se empleó también el método de inmersión de hojas de tomate. En este caso, se cortaron las hojas con las larvas L2 en su interior y se sumergieron en la concentración de insecticida empleada para la selección. La mortalidad se evaluó tras 96 horas.

2.5 Análisis de los datos

Se obtuvieron las curvas de dosis - mortalidad usando el programa estadístico POLO-Plus.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de la selección a clorantraniliprol de la población Sicilia. Se observa un aumento de la concentración del insecticida, hasta alcanzar la selección 4, en la que la mortalidad a 300 ppm es de 63,1%. En la Tabla 2 se presentan los resultados de los bioensayos de susceptibilidad realizados al inicio de la selección y en la selección 4. Se puede observar un aumento de la resistencia a clorantraniliprol en la selección 4, pero sin diferencias significativas con respecto a la selección 0. Sin embargo, tanto la CL50 de la selección 0 (47,7 ppm) como la CL50 de la selección 4 (147,2 ppm), son superiores a la dosis de campo de este insecticida (DC: 35 ppm). Estos valores de CL50 concuerdan con los resultados de un estudio de Roidakis et al. [7], en el cual se presentan los primeros casos de resistencia a clorantraniliprol en poblaciones italianas de *T. absoluta*, donde se encontraron poblaciones de *T. absoluta* con CL50 que iban desde 47,6 a 435,0 ppm.

En la Tabla 3 se presentan los resultados de la selección a clorantraniliprol en la población Calnegre. Se observa una disminución de la mortalidad conforme aumentamos la concentración del insecticida, obteniendo una selección 6 tratada a 25 ppm y con una mortalidad de 62,3%. En la Tabla 4 se comparan las CL50 al inicio de la selección (1,4 ppm) y en la selección 5 (29,1 ppm), obteniendo diferencias significativas entre ambas selecciones. Sin embargo, la CL50 alcanzada en la selección 5 está aún por debajo de la dosis de campo de clorantraniliprol (DC: 35 ppm). La CL50 de Calnegre al inicio de la selección se asemeja con los valores de CL50 encontrados en poblaciones griegas de *T. absoluta* [7], en donde la CL50 máxima encontrada fue de 2,45 ppm.

4. CONCLUSIONES

Con respecto a los resultados obtenidos, podemos concluir que estamos seleccionando dos poblaciones resistentes a clorantraniliprol, una española y otra italiana. La población Sicilia, a pesar de estar seleccionándose a 300 ppm, su CL50 en la selección 4 no es lo esperado, comparado con la CL50 de la población al inicio de la selección, por lo que se deduce que la selección no está aún estabilizada. Por otra parte, la población Calnegre se está seleccionando con bastante éxito, con diferencias significativas entre las CL50 de la selección 5 y la CL50 de la población de origen, lográndose una población seleccionada a clorantraniliprol más estable.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2011-25164) y los fondos europeos FEDER. También ha sido financiado parcialmente por DuPont e IRAC España. LGV agradece al MECD por la beca FPU (13/01528).

6. REFERENCIAS

- [1] Haddi, K., Berger, M., Bielza, P., Cifuentes, D., Field, L.M., Gorman, K., Rapisarda, C., Williamson, M.S., Bass, C. (2012). Identification of mutations associated with pyrethroid resistance in the voltage-gated sodium channel of the tomato leaf miner (*Tuta absoluta*). *Insect. Biochem. Molec.* 42, 506-513.
- [2] Urbaneja, A., González-Cabrera, J., Arnó, J., Gabarra, R. (2012). Prospects for the biological control of *Tuta absoluta* in tomatoes of the Mediterranean basin. *Pest. Manag. Sci.* 68, 1215-1222.
- [3] IRAC MoA Classification Scheme (Version 8.1) (2016). <http://www.irac-online.org>.
- [4] Su, J., Lai, T., Li, J. (2012). Susceptibility of field populations of *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) in China to chlorantraniliprole and the activities of detoxification enzymes. *Crop. Prot.* 42, 217-222.
- [5] Ribeiro, L.M.S., Wanderley-Teixeira, V., Ferreira, H.N., Teixeira, Á.A.C., Siqueira, H.A.A. (2014). Fitness costs associated with field-evolved resistance to chlorantraniliprole in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *B. Entomol. Res.* 104, 88-96.
- [6] Liu, X., Ning, Y., Wang, H., Wang, K. (2015). Cross-resistance, mode of inheritance, synergism, and fitness effects of cyantraniliprole resistance in *Plutella xylostella*. *Entomol. Exp. Appl.* 157, 271-278.

[7] Roditakis, E., Vasakis, E., Grispou, M., Stavrakaki, M., Nauen, R., Gravouil, M., Bassi, A. (2015). First report of *Tuta absoluta* resistance to diamide insecticides. J. Pest. Sci. 88, 9-16.

[8] García-Vidal, L., Martínez-Aguirre, M.R., Bielza, P. (2014). Línea base de susceptibilidad y selección de poblaciones resistentes de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). En: Actas del III Workshop en Investigación Agroalimentaria – WiA14, eds. (TAIDA-UPCT, Cartagena, España), p.101.

Tabla 1. Selección de resistencia a clorraniliprol en la población Sicilia.

Selección	ppm	Total larvas	% Mortalidad
S0	100-300	2080	58,7
S1	250-300	962	31,6
S2	300-500	1598	81,1
S3	300	769	72,8
S4	300	1624	63,1

Tabla 2. Toxicidad a clorraniliprol en diferentes selecciones de la población Sicilia.

Selección	CL50 (ppm)	LF (95%)
S0	47,7	24,5-183,1
S4	147,2	68,2-228

* **CL50:** Concentración Letal 50 en ppm.

LF (95%): Límites fiduciales calculados al 95%

Tabla 3. Selección de resistencia a clorraniliprol en la población Calnegre.

Selección	ppm	Total larvas	% Mortalidad
S0	1-3	319	90,6
S1	1	957	81,7
S2	1	706	55,9
S3	3-8	820	46,8
S4	10-15	882	61,5
S5	15-25	1070	51,3
S6	25	1049	62,3

Tabla 4. Toxicidad a clorraniliprol en diferentes selecciones de la población Calnegre.

Selección	CL50 (ppm)	LF (95%)
S0	1,4	1,1-2,1
S5	29,1	14,9-249,6

* **CL50:** Concentración Letal 50 en ppm.

LF (95%): Límites fiduciales calculados al 95%

Grafting of sweet pepper against to *Meloidogyne incognita* infestation: Physiological response

Injerto de pimiento frente a la infestación de *Meloidogyne incognita*: Respuesta fisiológica

A. Gálvez^{*1}, A. Lacasa², C. Ros², F.M. del Amor¹, J. López-Marín¹

¹Departamento de Hortofruticultura. IMIDA. La Alberca. Murcia. Spain

²Departamento de Biotecnología y Protección de Cultivos. IMIDA. La Alberca. Murcia. Spain

Abstract

Meloidogyne incognita is one of the main pathogens of pepper. Limiting the use of chemical fumigants, it has led to the use of rootstocks with nematode resistance genes as an effective alternative to control. The reiteration of some of these cultivation of rootstocks, causes the appearance of virulent populations. The evaluation of the physiological and agronomic characteristics of plants grafted on Atlante (Me3), C19 (Me3 in different background) and Robusto (Me1) against a virulent to Me3 gene population, shows that the graft on Robust and C19 with resistance genes Me 1 and Me 3 respectively *M. incognita*, improve the physiological response and agronomic against biotic stress caused by the nematode.

Keywords: *Capsicum annuum*; nematodes; resistance genes.

Resumen

Meloidogyne incognita es uno de los principales patógenos del pimiento. La limitación del uso de fumigantes químicos, ha conllevado al uso de porta-injertos con genes de resistencia al nematodo como eficaz alternativa a su control. La reiteración del cultivo de algunos de éstos porta-injertos, provoca la aparición de poblaciones virulentas. La evaluación sobre las características fisiológicas y agronómicas de plantas injertadas sobre Atlante (Me3), C19 (Me3 en diferente background) y Robusto (Me1) frente a una población virulenta al gen Me3, muestra que el injerto sobre Robusto y C19 con genes de resistencia Me1 y Me3 respectivamente a *M. incognita*, mejoran la respuesta fisiológica y agronómica frente al estrés biótico provocado por el nematodo.

Palabras clave: *Capsicum annuum*; nematodos; genes de resistencia.

1. INTRODUCCIÓN

Los nematodos del género *Meloidogyne* son uno de los principales patógenos de los cultivos protegidos debido a los daños que provocan en sus raíces, impidiendo a la planta una correcta absorción de agua y nutrientes, y que ocasionan pérdidas de cosecha además del coste de los medios utilizados para paliar los daños. En solanáceas como el tomate, estas pérdidas

* E-mail: 1297@coitarm.es

representan entre un 10 y un 15% de promedio [1], pudiéndose alcanzar entre un 30 y un 60% en suelos altamente infestados.

En los invernaderos de pimiento del Campo de Cartagena (Murcia) *Meloidogyne incognita* está ampliamente distribuido y tras la eliminación del bromuro de metilo, se ha convertido en un problema emergente en más del 40% de los invernaderos [2]. Los fumigantes químicos han sido la forma más extendida de control para mitigar sus efectos, sin embargo, las actuales limitaciones de su uso mediante regulaciones gubernamentales, han contribuido a un mayor énfasis en otras medidas de control [3].

El uso de cultivares resistentes como porta-injertos se considera como una estrategia viable para el control del nematodo [4]. En el pimiento se han identificado tres genes de resistencia frente a *M. incognita* denominados *Me1*, *Me3* y *N* [5]. El uso reiterado de porta-injertos portadores de *Me3* en un mismo suelo sin desinfectar, provoca la selección de poblaciones virulentas a este gen, evitándose esto con la combinación de la biosolarización [6].

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto provocado por los nematodos en la fisiología y en el comportamiento agronómico de plantas injertadas con genes de resistencia a *Meloidogyne incognita*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Se evaluaron plantas de la variedad Gacela 'F1' (Syngenta Seeds, Holanda) injertadas sobre tres porta-injertos comerciales: Atlante y C19 (Ramiro Arnedo, España) portadores del gen *Me3* introgresado en diferente background y Robusto (Syngenta Seeds, Holanda) portador del gen *Me1*. Plantas de Gacela sin injertar e injertadas sobre los mismos porta-injertos sin inocular, se usaron como control. Cada planta se cultivó individualmente en macetas de 10 l. y fue inoculada con 2400 J2 de nematodos de *M. incognita* raza [7] virulenta al gen *Me3* de resistencia [2, 8].

2.2 Parámetros medidos

La incidencia del nematodo se realizó mensualmente descubriendo parte de la raíz durante el cultivo y en su totalidad al final del ensayo, anotando el índice de agallas (IA) [9] y el porcentaje de plantas afectadas (% plantas afectadas).

Se analizó el intercambio de gases en hojas totalmente desarrolladas a los 205 DDT (días después del trasplante), de 9:00-11:00 am (GMT). La tasa fotosintética (Amax, $\mu\text{mol CO}_2/\text{m}^2\text{s}$), conductancia estomática (gs, $\text{mmol H}_2\text{O}/\text{m}^2\text{s}$), transpiración (E, $\text{mmol H}_2\text{O}/\text{m}^2\text{s}$) y CO_2 intercelular (C_i , $\mu\text{mol CO}_2/\text{mol aire}$) se midieron en condiciones constantes de saturación de luz (800 $\text{mmol}/\text{m}^2\text{s}$) y 400 ppm de CO_2 con un medidor de fotosíntesis portátil LI-6400 (LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska, USA). La producción comercial fue medida en cinco recolecciones.

2.3 Diseño del experimento y análisis estadístico

El diseño experimental fue en bloques al azar de 4 bloques por 5 repeticiones. Los resultados de incidencia del nematodo, índice y porcentaje medio de plantas afectadas, fueron transformados mediante la expresión $y = \arcsen\sqrt{x}$ ($x = \%$ plantas infestadas) y la expresión $y = \text{Log}_{10}(x+1)$ ($x =$ índice medio de agallas). Se calcularon las diferencias significativas por ANOVA y los resultados fueron comparados con una probabilidad de $P \leq 0.05$ de acuerdo al test LSD.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El IA y el % plantas afectadas por los nematodos en C19 (*Me3*), fueron inferiores a los observados en Atlante y la variedad susceptible, entre los que no se encuentran diferencias significativas debido a la virulencia mostrada por la población al gen *Me3* introgresado en el porta-injertos Atlante (2). Robusto (*Me1*) no se vio afectado por el nematodo.

Las plantas de Gacela y Atlante (*Me3*) inoculadas con nematodos, disminuyeron la fotosíntesis en un 27% y un 25% con respecto a las plantas no inoculadas (Tabla 1). El porta-injertos C19 (*Me3* en diferente background que Atlante), no vio reducida su fotosíntesis cuando estuvo inoculado con el nematodo. Las prestaciones del gen *Me3* en diferente fondo genético, no solo se observan en la infestación por el nematodo [8] sino también en la influencia sobre la fotosíntesis. El patrón Robusto (*Me1*) presenta la misma fotosíntesis entre plantas inoculadas y no inoculadas, al no infestarse con los nematodos (Tabla 2).

Para el resto de parámetros fisiológicos medidos, la tendencia es similar a la observada en la fotosíntesis. Gacela y Atlante cuando están inoculadas con nematodos, reducen significativamente sus valores de conductancia estomática (39% y 32% respectivamente), transpiración (20%), y concentración de CO₂ intercelular (7 y 35% respectivamente) frente a las plantas sin inocular (Tabla 2) y no encontrándose diferencias entre plantas inoculadas y no inoculadas en C19 y Robusto (Tabla 2). El injerto sobre determinados porta-injertos, mejora la variedad injertada frente al estrés provocado por el nematodo, al igual que ocurre frente a estreses abióticos, como la salinidad [10] y la temperatura y radiación solar [11].

En cuanto a la producción, se encontraron diferencias significativas entre plantas inoculadas y no inoculadas para Gacela y Atlante, siendo Gacela la que presenta una mayor reducción de la producción (Tabla 2). Robusto y C19 apenas vieron reducida su producción cuando estuvieron inoculados nematodos (Tabla 2).

4. CONCLUSIONES

La virulencia presentada por el aislado de *M. incognita* usado en el ensayo, pone de manifiesto que el injerto de las plantas susceptibles de Gacela sobre el patrón Atlante (*Me3*) se comportan al mismo nivel que las plantas de la variedad comercial sin injertar, no mejorando este porta-injertos la respuesta fisiológica y agronómica frente al estrés biótico provocado por los nematodos. El porta-injerto C19 portador del mismo gen que Atlante, mostró un buen comportamiento frente al aislado virulento y no se vieron afectados ni la producción ni los parámetros fisiológicos medidos, esto podría ser debido al fondo genético donde esta introgresado este gen. El injerto sobre el porta-injertos Robusto con gen de resistencia *Me1* a *M. incognita*, mejora la respuesta fisiológica y agronómica frente al estrés biótico provocado por el nematodo. Este ensayo se ha realizado para el caso, de que la presión de selección provocada por la reiteración del cultivo de porta-injertos resistentes a *Meloidogyne* con el gen *Me3*, produzca la aparición de poblaciones virulentas a este gen.

5. AGRADECIMIENTOS

Al proyecto de investigación FEDER PO 07-41, que está cofinanciado en un 80% por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional.

6. REFERENCIAS

- [1] Bello, A. P., Escuer, M., Pastrana, M.A. (1996). Nematodos fitoparásitos y su control en ambientes mediterráneos. En: Patología vegetal Tomo II, eds. (Llácer, G., López, M.M., Traperó, A y Bello, A., Sociedad Española de Fitopatología), p.1039-1069.
- [2] Ros, C., Robertson, L., Martínez, M.C., Lacasa, A. (2014). Development of virulence to *Meloidogyne incognita* on resistant pepper rootstocks. Spanish J. Agric. Res. 12(1), 225-232.
- [3] Ornat, C., Verdejo-Lucas, S., Sorribas, F.J. (2001). A population of *Meloidogyne javanica* in Spain virulent to the Mi resistance gene in tomato. Plant Dis. 85(3), 271-276.
- [4] Djian-Caporalino, C., Molinari, S., Palloix, A., Ciancio, A., Fazari, A., Marteu, N., Ris, N., Castagnone-Sereno, P. (2011). The reproductive potential of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* is affected by selection for virulence against major resistance genes from tomato and pepper. Eur. J. Plant Pathol. 131, 431-440.
- [5] Fazari, A., Palloix, A., Wang L.H., Hua M. Y., Sage-Palloix, A. M., Zhang B., X., Djian-Caporalino, C. (2012). The root-knot nematode resistance Ngene co-localizes in the Me-genes cluster on the pepper (*Capsicum annuum* L.) P9 chromosome. Plant Breed 131, 665-673.
- [6] Ros, C., Martínez, C., Sánchez, F., Lacasa, C.M., Guerrero, M.M., Lacasa, A. (2011). Biosolarización and grafting as a way mitigate the selection of virulent populations of *Meloidogyne incognita* in pepper. ISBN 978-92-9067-248-7 Bulletin OIBC/swrp 71: 113-116.
- [7] Robertson, L., López-Pérez, J.A., Bello, A., Díez-Rojo, M.A., Escuer, M., Piedra-Buena, A., Ros, C., Martínez, C. (2006). Characterization of *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* and *M. hapla* populations from Spain and Uruguay parasitizing pepper (*Capsicum annuum*). Crop Prot. 25, 440-445.
- [8] Sánchez-Solana, F. (2015). Influencia del fondo genético en la expresión de la resistencia a *Meloidogyne incognita* en pimiento (*Capsicum annuum* L.). Tesis doctoral UPCT.
- [9] Bridge, J.S., Page, L.J. (1980). Estimation of root-knot nematodes infestation levels on roots using a rating chart. Trop Pest Manage 26: 296-298.
- [10] Penella, C., Nebauer SG, López-Galarza S, San Bautista A, Gorbe E. 2013. Evaluation for salt stress tolerance of pepper genotypes to be used as rootstocks, J. Food Agric. Environ. 11 1101-1107.
- [11] López-Marín, J., González, A., Pérez-Alfocea, F., Egea-Gilabert, C., Fernández, J.A. (2012) Grafting is an efficient alternative to shading screens to alleviate thermal stress in greenhouse-grown sweet pepper. Sci. Horti-Amsterdam, 149,39-46.

Tabla 1. Porcentaje de plantas afectadas e índice de agallas en plantas inoculadas.

Parámetros	Gacela	Atlante	Robusto	C19
% Plantas afectadas ^a	100'0C	100'0C	0'0A	50'0B
Índice de agallas ^b	5'3C	5'2C	0'0A	0'6B

^a Test LSD al 95% con datos transformados mediante $\text{Arcsen}(\sqrt{x})$. ^b Test LSD al 95% con datos transformados mediante $\text{Log}_{10}(x)$.

Tabla 2. Parámetros fotosintéticos y producción con cada combinación de porta-injertos y control en plantas inoculadas (N) y no inoculadas (SN).

Parámetros	T	Gacela	Atlante	Robusto	C19
A ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	N	15'66Aa	16'55Aa	21'40Ba	21'69Ba
	SN	21'44 Ab	21'98Ab	22'33Aa	22'04Aa
gs ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	N	0'28Aa	0'32Aa	0'50Ba	0'57Ba
	SN	0,48Ab	0'47Ab	0'58Ba	0'58Ba
Ci ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$)	N	238'73Aa	246'05Aa	263'81Ba	262'26Ba
	SN	256'94Ab	254'12Ab	268'37Ba	264'56Ba
E ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	N	6'31Aa	7'29Aa	10'50Ba	11'03Ba
	SN	7'89Ab	9'11Ab	11'30Ba	11'36Ba
Producción (Kg/planta)	N	6'31Aa	7'29Aa	10'50Ba	11'03Ba
	SN	7'89Ab	9'11Ab	11'30Ba	11'36Ba

Letras diferentes indican diferencias significativas, las minúsculas entre patrones y las mayúsculas entre tratamientos (Test LSD, $P < 0,05$).

Comparison of potential irrigation strategies to confront water restriction period of yield and fruit quality in lemon tree

Evaluación de nuevas estrategias de manejo del riego para afrontar periodos de restricción hídrica sobre la producción y calidad del limonero

J. M. Robles* , J.G. Pérez-Pérez, P. Botía

Departamento de Recursos Naturales, Equipo de Riego y Fisiología del Estrés. Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), C/ Mayor s/n, La Alberca (Murcia), Spain.

Abstract

This study compared the agronomic response of two irrigation strategies (regulated saline irrigation (RSC) and regulated deficit irrigation (RDC)) for two seasons. Lemon trees 'Fino 49' (*Citrus limon* (L.) (Burm. fil.) of 15 years old grafted on *Citrus macrophylla* Wester were used. Three irrigation treatments were applied: Control (100% ET_c, non-saline water); RDC (25% ET_c, non-saline water) and RSC (145% ET_c, saline - 40 mM NaCl). The RDC and RSC treatments were maintained throughout the growing season, except during the period of high evapotranspiration (ET_o) (phase II of fruit growth) using 100% ET_c with non-saline water. The RDC treatment had no impact on the resources distribution, but in RSC, the accumulation of Cl⁻ in the leaf, affected much more production than vegetative growth. The total production was affected similarly, but the reduction was greater in the RSC in the second year. The RDC did not improve the EUA and the RSC reduced it by applying a leaching fraction. The RSC does not affect the quality of the fruit, while the RDC delayed fruit ripening.

Keywords: Citrus; Regulated deficit irrigation; Regulated saline irrigation.

Resumen

El presente estudio comparó la respuesta agronómica de dos estrategias de riego (riego salino controlado (RSC) y riego deficitario controlado (RDC)) durante dos campañas. Se utilizaron árboles de limonero 'Fino 49' (*Citrus limon* (L.) (Burm. fil.) de 15 años injertados sobre *Citrus macrophylla* Wester. Se aplicaron tres tratamientos de riego: Control (100% ET_c, de agua no salina); RDC (25% ET_c, de agua no salina) y el RSC (145% ET_c, agua salina 40 mM NaCl). Los tratamientos RDC y RSC se mantuvieron durante todo el ciclo de cultivo, excepto durante el período de alta evapotranspiración (ET_o) (fase II de crecimiento del fruto) aplicando el 100% ET_c con agua no salina. El tratamiento RDC no tuvo impacto en la distribución de recursos, pero en el RSC, la acumulación de Cl⁻ en hoja, afectó mucho más a la producción que al crecimiento vegetativo. La producción total se vio afectada de manera similar, pero la reducción fue mayor en el RSC en el segundo año. El RDC no mejoró la EUA y el RSC la redujo al aplicar una dosis de lavado. El RSC no afectó a la calidad del fruto, mientras que el RDC retrasó la maduración del fruto.

Palabras clave: Cítricos; Riego deficitario controlado; Riego salino controlado.

* E-mail: juanm.robles@carm.es

1. INTRODUCCIÓN

El limonero se cultiva principalmente en las regiones del Mediterráneo, con un clima semiárido (caracterizado por la escasez de lluvias y la alta evapotranspiración) donde tienen lugar largos períodos de escasez de agua, especialmente en verano. La escasez de recursos hídricos obliga a los productores de limones a optimizar el uso del agua principalmente de dos maneras; mediante la aplicación de estrategias de riego deficitario controlado (RDC) basado en la restricción del riego durante los periodos de menor sensibilidad al estrés hídrico, mientras que en el resto del ciclo de cultivo se aportan todos los requerimientos hídricos que necesita el cultivo [1]; o bien, mediante el uso de fuentes alternativas de agua, como las procedentes de pozos subterráneos de alta salinidad. Sin embargo, este tipo de agua, es a menudo de baja calidad debido a las concentraciones excesivas de sales solubles (Cl^- y/o Na^+) que incrementan la conductividad eléctrica (CE) en valores superiores a los 3 dS m^{-1} , valor considerado crítico para la producción de cítricos [2]. En cambio, si el agua salina se aplicara durante los meses de menor demanda evaporativa, después de la cosecha y durante la floración, cuajado y las fases I y III de crecimiento del fruto, utilizando agua no salina durante los meses de verano (fase II), se reduciría la acumulación de Cl^- en las hojas, ya que, depende de la corriente de transpiración [3], denominando a este tipo de manejo del riego, como riego salino controlado (RSC).

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar durante dos años de ensayo los efectos sobre la producción y calidad del fruto, de dos estrategias de manejo del riego, RDC y RSC, comparándolos con un tratamiento de riego del 100% ETc con agua no salina.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se realizó en una parcela experimental del IMIDA ubicada en Torre Pacheco, en árboles de 15 años de edad, de limonero 'Fino 49' (*Citrus limon* (L.) Burm. Fil.) injertados sobre el portainjerto *Citrus macrophylla* Wester, con un marco de plantación de $8 \times 3 \text{ m}$. Se aplicaron tres tratamientos de riego: Control (100% ETc con agua no salina - 0 mM de NaCl); RDC, riego deficitario controlado (25% ETc - 0 mM de NaCl), y RSC, riego salino controlado (145% ETc con agua salina - 40 mM de NaCl). Los tratamientos RDC y RSC se mantuvieron a lo largo de todo el ciclo de cultivo excepto en la fase II del crecimiento del fruto (final de junio-septiembre) que se regó al 100 % ETc. El contenido volumétrico de agua del suelo (θ_v) se midió utilizando una sonda de neutrones y el estado hídrico del cultivo mediante la medida del potencial hídrico de tallo al mediodía (Ψ_{md}), utilizando una cámara de presión. El control de la cosecha se realizó en noviembre pesando la producción y contando el número de frutos de cada árbol. También se calculó la eficiencia en el uso del agua (EUA), como la relación entre la cosecha y el agua de riego aplicada durante el ciclo de cultivo (kg m^{-3}), y el peso de poda (kg árbol^{-1}). Respecto a la calidad del fruto se analizó (diámetro del fruto (mm), porcentaje de zumo, sólidos solubles totales (°Brix) y acidez valorable (g L^{-1}). El análisis estadístico consistió en un ANOVA unifactorial con tres tratamientos y seis repeticiones por tratamiento (dos árboles monitoreados por tratamiento y bloque).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el tratamiento control se han aplicado 581 mm y 558 mm y en el tratamiento de RDC 425 mm y 358 mm de agua de buena calidad durante los años 2008 y 2009 respectivamente. El tratamiento de RSC recibió un total de 651 mm (401 mm agua no salina + 250 mm agua salina) y 661 mm (303 mm agua no salina + 358 mm agua salina) en 2008 y 2009, de acuerdo al criterio indicado en el material y métodos. Las estrategias de riego impuestas durante los dos años del ensayo a través de los tratamientos RSC y RDC han permitido un ahorro medio de agua no salina del 31% y 38%, respectivamente. El tratamiento de RDC disminuyó el θ_v durante los períodos de

estrés (Figura 1A) mientras que el tratamiento RSC aumentó la CE_{SS} en la solución del suelo (Figura 2C). El déficit de agua en el suelo impuesto por la estrategia de RDC afectó negativamente el estado hídrico de la planta, produciendo valores mínimos de Ψ_{md} de -1,9 MPa en la fase I en 2008 y 2009 y alrededor de -1,5 MPa en la fase III, en el año 2009. Estos valores bajos de Ψ_{md} han afectado a los procesos fisiológicos del cultivo, con consecuencias negativas para el crecimiento de la planta y del fruto (Tabla 1). El uso de agua salina en el tratamiento RSC aumentó la concentración de Cl^- en hoja (Figura 2A y B), pero no afectó al estado hídrico de la planta, con valores de Ψ_{md} similares al control (Figura 1B). En el tratamiento de RDC el crecimiento vegetativo disminuyó debido a cambios en el estado hídrico (Figura 1B), mientras que en el tratamiento de RSC fue debido a la toxicidad por acumulación de Cl^- en hoja (Figura 2). Al comparar las dos estrategias, el RDC no tuvo impacto en la distribución de recursos, pero en el caso del RSC, la acumulación de Cl^- en hoja afectó a la producción mucho más que el crecimiento vegetativo. El tratamiento de RDC mantuvo la EUA similar a los árboles control (Tabla 1), mientras que la EUA en el tratamiento de RSC se redujo significativamente debido a la dosis de agua salina extra (fracción de lavado) que se aplicó durante los períodos de estrés (Tabla 1). El tratamiento de RDC disminuyó la producción del cultivo debido al estrés sufrido durante la fase-I, que afectó al número de frutos, y al estrés sufrido durante la fase-III, que redujo el peso medio del fruto [4], mientras que en el tratamiento de RSC, la reducción de la producción fue provocada por la acumulación de Cl^- en hoja durante los periodos de estrés, afectando principalmente al número de frutos por árbol durante en segundo año del ensayo [5]. El tratamiento de RSC no influyó significativamente la calidad del fruto, pero el tratamiento de RDC retrasó la maduración del fruto (Tabla 1), debido a la reducción del diámetro del fruto y del porcentaje de zumo, principalmente en el segundo año, además de un aumento de la acidez valorable y SST respecto al tratamiento control.

4. CONCLUSIONES

Ambas estrategias son recomendables en condiciones de escasez de agua, pero el RDC es la estrategia de riego más adecuada para un período de restricción a largo plazo, ya que, la reducción de la cosecha está relacionada con el ahorro de agua obtenido, mientras que la estrategia de RSC es recomendable durante un período inferior un año al disminuir progresivamente la producción.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por el proyecto POI07-12 y el contrato FIT a través del programa FEDER-80% y por el proyecto INIA (RTA2012-00102-00-00)

6. REFERENCIAS

- [1] Lampinen, B.D., Shackel, K.A., Southwick, S.M., Olson, B., Yeager, Y.T. (1995). Sensitivity of yield and fruit quality of French prune to water deprivation at different fruit growth stages. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 120, 139-147.
- [2] García-Sánchez, F., Jifon, J., Carvajal, M., Syvertsen, J.P. (2002). Gas exchange, chlorophyll and nutrient contents in relation to Na^+ and Cl^- accumulation in 'Sunburst' mandarin grafted on different rootstock. *Plant Sci.* 162, 705-712.
- [3] Syvertsen, J.P., Melgar, J.C., García-Sánchez, F. (2010). Salinity tolerance and water use efficiency in citrus. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 135, 33-39.
- [4] Pérez-Pérez, J.G., Romero, P., Navarro, J.M., Botía, P. (2008). Response of sweet orange cv 'Lane late' to deficit-irrigation strategy in two rootstocks. II. Flowering, fruit growth, yield and fruit quality. *Irrig. Sci.* 26 (6), 834-839.
- [5] García-Sánchez, F., Carvajal, M., Porras, I., Martínez, V. (2003). Effects of salinity and rate of irrigation on yield, fruit quality and mineral composition of 'Fino 49' lemon. *Eur. J. Agron.* 19, 427-437.

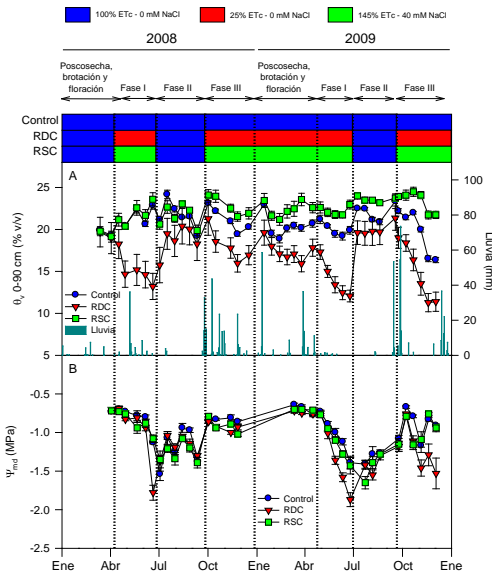


Figura 1. Evolución estacional del contenido volumétrico de agua en el suelo (θ_v) (0-90 cm), y lluvia (A) y del potencial hídrico del tallo al mediodía (Ψ_{md}) (B).

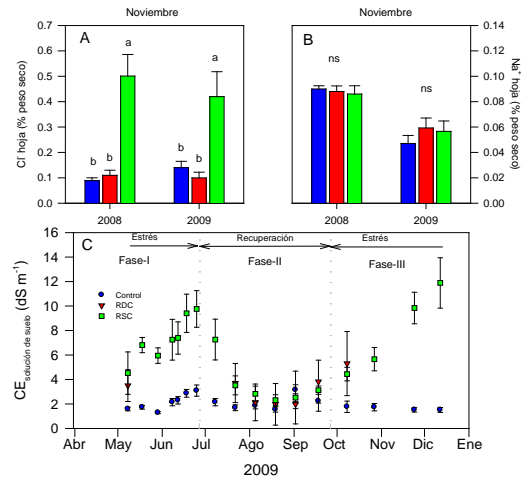


Figura 2. Concentración de Cl⁻ y Na⁺ en hoja (A y B) y evolución estacional de la conductividad eléctrica del extracto saturado del suelo (CE_{ss}) (C).

Tabla 1. Parámetros productivos, eficiencia productiva del uso del agua (EUA), peso de poda y parámetros de calidad del fruto.

2008	Control	RDC	RSC	ANOVA
Producción (kg árbol ⁻¹)	115,2 a	75,7 b	95,7 ab	**
Carga (nº. frutos árbol ⁻¹)	829 a	600 b	728 ab	*
Peso medio del fruto (g fruto ⁻¹)	139 a	126 b	131 ab	*
EUA (kg m ⁻³)	8,27 a	7,43 ab	6,13 b	*
Peso de poda (kg árbol ⁻¹)	18,9	17,7	16,3	ns
Diámetro fruto (mm)	62,7 a	61,1 b	60,2 b	**
Zumo (%)	37,2	36,7	37,1	ns
Sólidos solubles totales (°Brix)	7,3	7,4	7,4	ns
Acidez valorable (g L ⁻¹)	59,4	59,7	61,4	ns
2009				
Producción (kg árbol ⁻¹)	106,4 a	64,7 b	57,5 b	***
Carga (nº. frutos árbol ⁻¹)	903 a	603 b	509 b	*
Peso medio del fruto (g fruto ⁻¹)	118 a	107 b	114 ab	*
EUA (kg m ⁻³)	7,97 a	7,54 a	3,64 b	***
Peso de poda (kg árbol ⁻¹)	19,6 a	13,3 b	14,4 b	*
Diámetro fruto (mm)	61,3 a	59,2 b	62,1 a	***
Zumo (%)	35,7 a	31,7 b	36,6 a	*
Sólidos solubles totales (°Brix)	7,6 b	8,6 a	7,7 b	*
Acidez valorable (g L ⁻¹)	59,9 b	66,1 a	62,6 b	**
2008-2009				
Producción (kg árbol ⁻¹)	221,7 a	140,4 b	153,2 b	***
Carga (nº. frutos árbol ⁻¹)	1732 a	1203 b	1237 b	***
Peso medio del fruto (g fruto ⁻¹)	128 a	117 b	124 ab	*
EUA (kg m ⁻³)	8,12 a	7,48 a	4,88 b	***
Peso de poda (kg árbol ⁻¹)	38,5 a	30,9 b	30,7 b	*

Los valores representan las medias de seis repeticiones. 'ns' no significativo; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Para cada fila, los valores con letras diferentes indican diferencias significativas a $P \leq 0,05$, por el test de Duncan



ORAL SESSION IV

Agroforestry and
Economy Engineering

Crop coefficients parameterization using remote sensing in basin-scale hydrological modelling

Parametrización de coeficientes de cultivo a partir de teledetección y su uso en modelización hidrológica a escala de cuenca

JE Hunink^{*1}, J.P.C. Eekhout², J. de Vente², S. Contreras¹, P. Droogers¹, A. Baille¹

¹FutureWater, Calle Azucena 23, Cartagena, Spain.

²Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS), Spanish National Research Council (CSIC), PO Box 164, 30100 Murcia, Spain

Abstract

A distributed hydrologic model is used to evaluate how different methods to estimate evapotranspiration (ET_c) influence the water balance and hydrologic response of basins. The study site, the upper Segura basin (~2500 km²) in Spain, is characterized by a wide range of terrain, soil, and ecosystem conditions. Input and calibration data for the hydrological model SPHY are obtained from best available data sources. The model was setup for a period of 15 year. Five crop coefficient parameterization methods are compared to explore the impact of spatial and temporal variations in these input datasets on actual evapotranspiration, streamflow and soil moisture. Methods include three that are based on remote sensing information; one based on FAO literature, and another that takes the crop coefficient equal to unity for the entire basin. The analysis shows that basin-level streamflow is hardly influenced by the choice in parameterization, but actual evapotranspiration and soil moisture are quite different, especially in the wet season and for the FAO-based method.

Keywords: evapotranspiration; satellite imagery; watershed hydrology.

Resumen

Se utiliza un modelo hidrológico distribuido para evaluar cómo diferentes métodos influyen en la estimación de la evapotranspiración (ET_c) y el balance de agua a escala de cuenca. La zona de estudio se ubica en la cuenca alta del Segura (~ 2.500 km²) en el Sureste español, zona caracterizada por una elevada heterogeneidad de condiciones del terreno y usos del suelo. El modelo hidrológico SPHY fue desarrollado y calibrado para un período de simulación de 15 años. Se emplearon cinco métodos para parametrizar el coeficiente de cultivo y se compararon los patrones espaciales y las dinámicas temporales simuladas para la evapotranspiración, la humedad del suelo y los caudales. Tres de los cinco métodos utilizan información de satélite, otro los valores del coeficiente de cultivo establecidos por FAO, y el último asume un valor constante para toda la cuenca y periodo de simulación. El análisis muestra que la generación de caudales apenas se ve afectada por la selección del método de parametrización, aunque sí es importante a la hora de calcular la evapotranspiración real, especialmente durante épocas húmedas y para los valores tabulados de FAO.

* E-mail: j.hunink@futurewater.es

Palabras clave: evapotranspiración; imágenes satelitales; hidrología de cuenca.

1. INTRODUCTION

Improvements in data availability, including satellite imagery, have increased the use and applications of distributed high-resolution hydrological models [1-3]. Remote sensing information is also being increasingly used in applications on plot-scale using agro-hydrological models [4,5]. In spite of the potential of remote sensing information to parameterize evapotranspiration (ET) processes, models used by practitioners for planning, engineering design and other type of decision making on basin scale, generally consider relatively simple representations of the evapotranspiration process [5-7]. A better representation of ET has the potential to improve streamflow prediction [8], especially in semi-arid basins where evapotranspiration generally has a larger share in the water balance than runoff [9]. The size of the study area may also affect the influence of the crop parameterization method [10,11]. At the same time, crop evapotranspiration parameterization may be less important for streamflow estimation in larger basins, but it may be critical for other variables (e.g. soil moisture, recharge) [2,12,13]. Also, the choice of the crop evapotranspiration parameterization may be more relevant in certain seasons than in others, e.g. [14].

The objective of this study is to explore how different methods used for the parameterization of crop evapotranspiration affects hydrological model outcomes. This will improve our understanding of (i) the sensitivity of different output variables to the parameterization approaches, and (ii) the effect of catchment size and season (dry vs wet) on this parameterization.

2. METHODS

2.1 Study basin and model

The study is performed in the Upper Segura basin (SE Spain). The basin covers an approximate area of 2500 km² and the dominant lithology consists of marls and limestones. Average annual rainfall is 400 mm and elevation ranges between 488 and 1749 m.a.s.l. The landscape represents rainfed farming, forests (mainly pine tree) and shrublands. The basin includes four reservoirs, their main purpose being irrigation water storage.

The hydrological model used is SPHY (*Spatial Processes in Hydrology*). SPHY is a spatially distributed leaky bucket type of model that is applied on a cell-by-cell basis. More details on the model and its applications are given by [15]. Main input data used for this study are: digital elevation model (SRTM), rainfall and temperature station data (CHS, AEMET), Landcover (Corine) and maps with soil physical properties (CEBAS).

2.2 Crop coefficient parameterization scenarios

For this study we assume that the best available data related to crop coefficients are Normalized Difference Vegetation Index (NDVI) observations [16]. We use a linear parameterization for the NDVI- k_c relationship in which the minimum values for the crop coefficient ($k_{c,min}$) are reached in bare soils, and the maximum ones ($k_{c,max}$) are expected to be reached when vegetation/crop is growing at its optimum agronomic condition. The SPHY model forced with dynamic bi-monthly NDVI observations to derive crop coefficients can be considered as the most accurate model, hereafter called "reference model". This reference model is calibrated using monthly reservoir inflow data for a period of 10 years (2001-2010), using data for three reservoirs. The validation period of the model is 2011-2015.

A second model is built by altering the crop coefficient parameterization of the calibrated model with the annual k_c pattern based on standard FAO literature values per land use type. This

model is compared to the NDVI-based reference model. To understand the impact of catchment size, a representative sample of different catchment size classes across the basin was collected. The catchment size classes were: 0.1, 1, 10, 100 and 1000 km². For example, for the first catchment size class, a total of 100 catchments in the basin were selected, all having a total drainage area of approximately 0.1 km².

3. RESULTS AND DISCUSSION

The model was calibrated and validated successfully (not shown here). Fig. 1 shows the deviation (mm/month) of streamflow and actual evapotranspiration at basin-scale for the FAO-based model. Streamflow is lower and more or less constant throughout the year, due to the higher evapotranspiration demands as compared to the reference model. This demonstrates the impact of soil moisture storage, which reaches its maximum at the start of the year (not shown here). From April onwards, soil moisture will limit actual evapotranspiration rates.

Streamflow is thus hardly affected by the choice of the crop coefficient parameterization method (Fig. 1). However, the difference in streamflow is more significant for smaller sub-watersheds as shown in Fig. 2, which shows that the Normalized RMSE, as an indicator of relative deviation from the reference model, generally increases for smaller watersheds, especially for actual evapotranspiration.

4. CONCLUSIONS

Overall, the choice of crop parameterization model is not important for monthly streamflow in the semi-arid basin studied at the basin scale. However, spatial and temporal differences in model outputs can be significant at smaller spatial and temporal scales. The classical FAO-based approach led to most significant deviations in streamflow and actual evapotranspiration estimates compared to the reference model. Further work should focus on the influence of soil moisture on the studied patterns and a more in-depth analysis of the impact of different spatial and temporal scales.

5. REFERENCES

- [1] Fatichi, S., Vivoni, E. R., Ogden, F. L., Ivanov, V. Y., Mirus, B., Gochis, D., Downer, C. W., Camporese, J. H., Davison, B., Ebel, N., Jones, J., Kim, G., Mascaro, R., Niswonger, P., Restrepo, R., Rigon, C., Shen, M., Sulis, M., Tarboton, D. (2016). An overview of current applications, challenges, and future trends in distributed process-based models in hydrology. *J. Hydrol.* 537, 45–60.
- [2] Knoche, M., Fischer, C., Pohl, E., Krause, P., Merz, R. (2014). Combined uncertainty of hydrological model complexity and satellite-based forcing data evaluated in two data-scarce semi-arid catchments in Ethiopia. *J. Hydrol.* 519, 2049–2066.
- [3] Spies, R. R., Franz, K. J., Hogue, T. S., Bowman, A. L. (2015). Distributed Hydrologic Modeling Using Satellite-Derived Potential Evapotranspiration. *J. Hydrometeorol.* 16, 129–146.
- [4] Pôças, I., Paço, T., Paredes, P., Cunha, M., Pereira, L. (2015). Estimation of Actual Crop Coefficients Using Remotely Sensed Vegetation Indices and Soil Water Balance Modelled Data. *Remote Sens.* 7, 2373–2400.
- [5] Maselli, F., Papale, M., Chiesi, G., Matteucci, L., Angeli, A., Raschi, A., Seufert, G. (2014). Operational monitoring of daily evapotranspiration by the combination of MODIS NDVI and ground meteorological data: Application and evaluation in Central Italy. *Remote Sens. Environ.* 152, 279–290.
- [6] Robles-Morua, A., Che, A. S., Mayer, E. R., Vivoni, E. R. (2014). Hydrological assessment of proposed reservoirs in the Sonora River Basin, Mexico, under historical and future climate scenarios. *Hydrol. Sci. J.* 60, 50–66.
- [7] Eum, H.-I., Vasan, A., Simonovic, S. P. (2012). Integrated Reservoir Management System for Flood Risk Assessment Under Climate Change. *Water Resour. Manag.* 26, 3785–3802.

- [8] Kunnath-Poovakka, A., Ryu, L. J., Renzullo, B., George, B. (2016). The efficacy of calibrating hydrologic model using remotely sensed evapotranspiration and soil moisture for streamflow prediction. *J. Hydrol.* 535, 509–524.
- [9] Ye, W., Bates, N. R., Viney, Sivapalan, M., Jakeman, A. J. (1997). Performance of conceptual rainfall-runoff models in low-yielding ephemeral catchments. *Water Resour. Res.* 33, 153–166.
- [10] Mascaro, G., Vivoni, E. R., Méndez-Barroso, L. A. (2015). Hyperresolution hydrologic modeling in a regional watershed and its interpretation using empirical orthogonal functions. *Adv. Water Resour.* 83, 190–206.
- [11] Donohue, R. J., Roderick, M. L., McVicar, T. R. (2007). On the importance of including vegetation dynamics in Budyko’s hydrological model. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 11, 983–995.
- [12] Vivoni, E. R., Entekhabi, R. L., Bras, L., Ivanov, V. Y. (2007). Controls on runoff generation and scale-dependence in a distributed hydrologic model. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 11, 1683–1701.
- [13] Jepsen, S. M., Harmon, T. C., Shi, Y. (2016). Watershed model calibration to the base flow recession curve with and without evapotranspiration effects. *Water Resour. Res.* 1, 1-10.
- [14] Robles-Morua, A., Vivoni, E. R., Mayer, A. S. (2012). Distributed Hydrologic Modeling in Northwest Mexico Reveals the Links between Runoff Mechanisms and Evapotranspiration. *J. Hydrometeorol.* 13, 785–807.
- [15] Terink, W., Lutz, A. F., Simons, G. W. H., Immerzeel, W. W., Droogers, P. (2015). SPHY v2.0: Spatial Processes in HYdrology. *Geosci. Model Dev. Discuss.* 8, 1687–1748.
- [16] Senay, G. B., Leake, S., Nagler, P. L., Artan, G., Dickinson, J., Cordova, J. T., Glenn, E. P. (2011). Estimating basin scale evapotranspiration (ET) by water balance and remote sensing methods. *Hydrol. Process.* 25, 4037–4049.

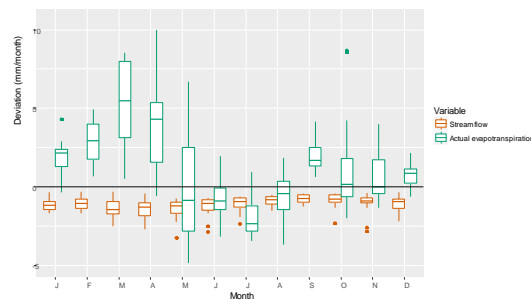


Figure 1: Boxplots showing the monthly deviation (mm/month) of the FAO method compared to the reference model for streamflow and ETa at basin-scale. Positive deviations mean higher values for the FAO-based model

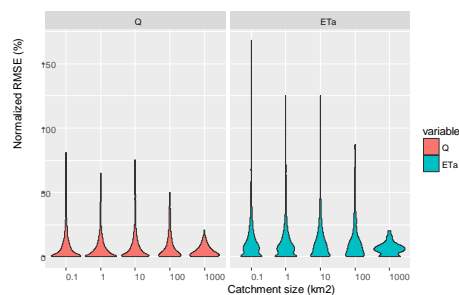


Figure 2: Violin plots (rotated histograms) of streamflow expressed as Normalized RMSE compared to reference run, for 5 catchment size classes based on monthly simulation outputs

Estimating evapotranspiration in the Segura River Basin from remote sensing data

Estimación de la evapotranspiración en la Cuenca del Río Segura desde imágenes de satélite

J. A. Martínez Pérez^{*1}, S. García-Galiano¹, A. Baille²

¹ Grupo de Gestión de Recursos Hídricos, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 52. 30203 Cartagena. Spain.

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

Abstract

This paper presents and validates an operational methodology, based on the use of land surface temperature (LST) and vegetation index (IV), for estimating and mapping actual evapotranspiration (ET) from satellite imagery (Landsat5 TM) in Segura river basin. The method was validated with measurements of ET realized by the eddy covariance technique in two citrus orchards of Campo de Cartagena (Spain). The good fit ($R^2 > 0.80$, RMSE of ± 50 W/m²) demonstrates the usefulness of satellite observations for estimating ET at the farm level.

Keywords: vegetation index; land surface temperature; evaporative fraction; Landsat.

Resumen

Este trabajo presenta y valida una metodología operacional, basada en el análisis del espacio temperatura de superficie (LST) vs índice de vegetación (IV), para la estimación y la cartografía de evapotranspiración real (ET) a partir de imágenes satelitales (Landsat 5 TM) en la Cuenca del Segura. El método ha sido validado con observaciones llevadas a cabo con la técnica de covarianza de remolinos en dos parcelas del Campo de Cartagena (España). El ajuste alcanzado ($R^2 > 0.80$, y RMSE ± 50 W/m²), demuestra la validez de la información satelital para la estimación de ET a nivel de parcela.

Palabras clave: índice de vegetación; temperatura superficial; fracción evaporativa; Landsat.

1. INTRODUCCIÓN

La evapotranspiración real (ET_{real}) es una importante componente del ciclo del agua y del balance de energía superficial. Por ello, cuantificar y cartografiar el flujo de calor latente es una importante información en áreas semiáridas, donde el déficit hídrico se ha convertido en el mayor obstáculo para el desarrollo de una economía sostenible [1]. Más aun, en nuestra zona de estudio (Cuenca del Río Segura), donde el sector agrícola (regadíos) representa cerca de 80% de la demanda total de la Cuenca.

* E-mail: joseangel.martinez@upct.es

Este trabajo presenta y valida una metodología operacional para la estimación y la cartografía de ETreal a partir de imágenes satelitales (Landsat 5 TM) cuya cadena de tratamiento se compone de las siguientes etapas: (i) correcciones atmosféricas y topográficas, (ii) corrección de temperatura de aire, (iii) eliminación de datos inconsistentes, (iv) programación automática de detección de bordes y (v) estimación de ETreal mediante un algoritmo gráfico propuesto por [2].

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Para la validación de la herramienta, se han utilizado medidas de ETreal llevadas a cabo en dos fincas comerciales de naranjos, situadas en el Campo de Cartagena (Murcia): Casa Mulero (Parcela A) y Villa Antonia (Parcela B). Están equipadas con torres de flujo que miden ET con la técnica de covarianza de remolinos (eddy-covariance), además de otras variables de superficie.

La información satelital empleada consiste en 11 imágenes Landsat 5TM, tomadas entre 2009 y 2011, a las que se ha aplicado correcciones radiométricas[3], obteniendo LST (Land Surface Temperature), índice de vegetación NDVI (Normalised Difference Vegetation Index) y demás variables requeridas. Otra información empleada es el producto MOD05 L2 de TERRA MODIS, necesario para la corrección por vapor de agua atmosférico, e imágenes de turbidez atmosférica para el cálculo de la radiación solar incidente.

La distribución espacial de la temperatura del aire (T_a), necesaria para la corrección de LST se ha generado empleando un modelo de regresión múltiple, usando las variables-elevación, longitud, latitud y distancia al mar [4]. Se ha empleado la cartografía del Sistema de Información sobre Ocupación del Suelo de España (SIOSE) para discriminar a escala 1:25000, áreas susceptibles de producirse evapotranspiración, excluyendo áreas sin vegetación, artificiales y de agua.

2.2 Algoritmo para el cálculo de ETreal

El algoritmo utilizado es el propuesto por [2], basado en la interpretación del espacio LST vs NDVI. El análisis de este espacio permite identificar dos rectas delimitando: (i) las condiciones de suelo seco (LSTmax), y (ii) las condiciones no limitantes de agua (LSTmin). Una vez determinadas estas rectas, se deduce por interpolación el parámetro ϕ de la fórmula de Priestley-Taylor:

$$\lambda ET = \phi \left[\frac{\Delta}{\Delta + \gamma} \right] (R_n - G) \quad (1)$$

Siendo Δ (Pa K^{-1}) la pendiente de la curva de presión de vapor saturado, γ la constante psicométrica (Pa K^{-1}), R_n la radiación neta y G el flujo del calor del suelo. La fracción evaporativa, definida por $EF = ET/(R_n - G)$, se obtiene como:

$$EF = \phi \left[\frac{\Delta}{\Delta + \gamma} \right] \quad (2)$$

El valor de ϕ para un pixel con una temperatura observada es obtenido por interpolación lineal entre el extremo superior ($\phi_{\max} = 1.26$) e inferior del triángulo ($\phi_{\min} = 0$). Para tener en cuenta la variabilidad espacial de la temperatura del aire, se ha aplicado la corrección propuesta por [5], utilizando la diferencia de temperatura $DT = LST - T_a$. Considerando la relación espacial entre el índice de vegetación (IV) and DT , ϕ se obtiene con la relación siguiente:

$$\phi = \phi_{\max} \frac{DT_{\max} - DT_{obs}}{DT_{\max} - DT_{\min}} \quad (3)$$

La radiación neta es derivada de la siguiente ecuación:

$$R_n = (1-a) \cdot R_s + L_d - L_{up} \quad (4)$$

Donde R_s es la radiación de onda corta incidente calculada según [6], a es el albedo, y L_d and L_{up} son la radiación de onda larga incidente y emitida respectivamente, calculadas según [7]. El flujo de calor por conducción G a la interfase superficie/atmósfera se ha calculado según [8], considerando que G es proporcional a R_n ; ($G = \alpha R_n$) y que α es una función lineal de EF ($\alpha = a + b EF$, con $a = 0.22$ y $b = -0.23$)

2.3 Algoritmo para la determinación de los bordes

Se ha utilizado el algoritmo propuesto por [1] para identificar los bordes seco e humedo, Se ha introducido una modificación de dicho algoritmo, mediante un método iterativo de cálculo del borde humedo por minimización del RMSE (Error Medio Cuadrático) entre valores observados y estimados.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han testado diferentes configuraciones del espacio temperatura superficial versus índice de vegetación (triangular, rectangular, trapezoidal), siendo la forma trapezoidal la que presenta el ajuste más satisfactorio. La correlación entre medidas y estimaciones es alta, en torno a $R^2 = 0.80$ (ver Tabla 1). El RMSE obtenido en la parcela B es de 50 W/m^2 frente a 36 W/m^2 de la parcela A. Esta tendencia es confirmada con los valores alcanzados por el MAPE (Error Porcentual Absoluto Medio), un 17 % de la parcela A frente a los 28 % de la parcela B. A modo de ejemplo, la Fig. 1 presenta una distribución espacial de ET obtenida desde Landsat en la zona regable del Campo de Cartagena para la fecha 28/11/2011 y la correspondiente distribución de frecuencias. Presenta un valor medio de 201.6 W/m^2 , con un coeficiente de variación de 26.6%.

4. CONCLUSIONES

Con la herramienta presentada en este trabajo, se ha demostrado que es posible estimar ET con una buena precisión en base exclusivamente a la información proporcionada por imágenes satelitales como Landsat. Los buenos resultados obtenidos están determinados por los siguientes factores:

- Inclusión de mapas de usos del suelo para eliminar pixeles que pudieran introducir falsos mínimos o máximos en la definición de bordes, ya que el método es muy sensible a la definición de los bordes.
- Empleo de un algoritmo que permita definir correctamente los bordes.
- Consideración de la variación espacial de T_a , de no emplearla podría llegar a contribuir a errores del orden 20-30 %.

5. AGRADECIMIENTOS

Se agradece la financiación recibida de los siguientes proyectos de I+D: EC-DG ENV ref. 241559. REDSIM, EU FP7-245159 SIRRIMED, y CGL2012-39895-C02-01 HYDROCLIM.

6. REFERENCIAS

- [1] Tang, R., Li, Z. L., Tang, B. (2010). An application of the Ts-VI triangle method with enhanced edges determination for evapotranspiration estimation from MODIS data in arid and semi-arid regions: Implementation and validation. *Remote Sens. Environ.* 114 (3), 540-551.
- [2] Jiang, L., Islam, S. (2001). Estimation of surface evaporation map over southern GreatPlains using remote sensing data. *Water Resour. Res.* 37(2), 329-340.
- [3] Chuvieco, E., Hantson, S. (2010). Procesamiento estándar de imágenes Landsat. Documento técnico de algoritmos a aplicar, Version1. Plan Nacional de Teledetección. Instituto Geográfico Nacional, Madrid.
- [4] Cristóbal, J., Ninyerola, M., Pons, X. (2008). Modeling air temperature through a combination of remote sensing and GIS data. *J. Geophys. Res.* 113, D13106.
- [5] Kalma, J. D., McVicar, T. R., McCabe, M. F. (2008). Estimating land surface evaporation: a review of methods using remotely sensed surface temperature data. *Surv. Geophys* 29, 421-469.
- [6] Sári M., Hofierka J. (2004). A new GIS-based solar radiation model and its application to photovoltaic assessments. *Trans. GIS* 8(2), 175-190.
- [7] Bisht, G., Venturini, V., Islam, S., Jiang, L. (2005). Estimation of the net radiation using MODIS (Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer) data for clear sky days. *Remote Sens. Environ.* 97, 52-67.
- [8] Tanguy, M., Baille, A., González-Real, M., Lloyd, C., Cappelaere, B., Kergoat, L., Cohard, J. (2012). A new parameterisation scheme of ground heat flux for land surface flux retrieval from MODIS products. *J. Hydrol.* 454-455, 113-122.

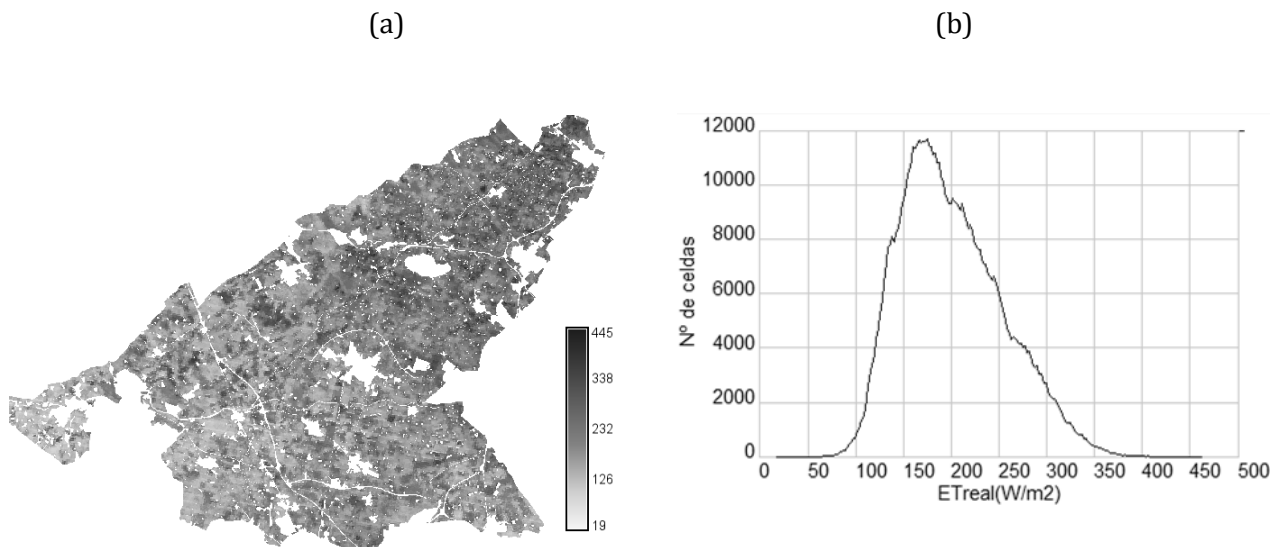


Figura 1. ETreal en la zona regable del Campo de Cartagena estimada desde Landsat para la fecha 28/06/2011: (a) distribución espacial; y (b) distribución de frecuencias

Tabla 1. Resumen de la precisión alcanzada en las Parcelas.

	Parcela A	Parcela B
Correlación (%)	0.82	0.87
Error Medio cuadrático (W/m ²)	36.6	55
Error absoluto medio (W/m ²)	30.75	50.5
Error medio porcentual absoluto (%)	17	28

Maintenance cost analysis of the Historic Garden “El Huerto de las Bolas”

Análisis de los costes de mantenimiento del Jardín Histórico “El Huerto de las Bolas”

S. Gómez*, P. Satoca, F. J. Alcón

Departamento de Economía de la Empresa, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena, Murcia, Spain.

Abstract

The economic analysis of a public garden maintenance within a specific context is an issue very little dealt with in scientific literature and little questioned by society. In this sense, the aim of this work is to analyze the maintenance costs of a public garden having a differentiated maintenance due to its condition of Historic Garden and Asset of Cultural Interest (BIC in Spanish), as it is the case for the garden “El Huerto de las Bolas” in the city of Cartagena. For that purpose, a cost analysis methodology has been used, whose information corresponds to work done on site and a valuation based on market prices. Results show a maintenance cost of 162,688.59 €/year, from which 24,109 €/year correspond to fixed costs, 105,173 €/year correspond to variable costs and the rest to financial interests and taxes. These results bring a unitary cost of about 4.2 €/m² which, although it is a value below the average of the Township (~5 €/m²), it is a reasonable one and fits in the logical cost of any other garden with similar dimensions.

Keywords: Economic analysis; urban green space; cost methodology.

Resumen

El análisis económico del mantenimiento de un jardín público en un contexto específico es un tema poco abordado en la literatura científica y poco cuestionado por la sociedad. En este sentido, el objetivo de este trabajo es analizar de los costes de mantenimiento de un jardín público con un mantenimiento diferenciado por su condición de Jardín Histórico y Bien de Interés Cultural como lo es “El Huerto de las Bolas” en Cartagena. Para ello, se realiza un análisis de costes a partir de información obtenida del trabajo de campo realizado y de una valoración a precios de mercado. Los resultados muestran un coste de mantenimiento de 162.689 €/año, de los cuales 24.109 €/año corresponden a costes fijos, 105.173 €/año a costes variables y el resto a intereses e impuestos. Estos resultados arrojan un coste por superficie de aproximadamente 4,2 €/m² que, aunque es un valor inferior al de la media del Municipio (~5€/m²), resulta un valor razonable y dentro de un coste lógico para cualquier jardín de dimensiones similares.

Palabras clave: Análisis económico; espacio verde urbano; metodología de costes.

* E-mail: samu.ct@gmail.com

1. INTRODUCCIÓN

El diseño, mantenimiento y conservación de espacios verdes públicos es una labor de vital importancia para el mantenimiento de un nivel de bienestar social en los núcleos urbanos, siendo muy relevante el conocimiento profundo y racional de los costes asociados a bienes públicos en general y, en este caso, de un espacio verde urbano en particular. A pesar de acometerse algunas acciones para poner en valor ciertos espacios verdes, como la declaración de Bien de Interés Cultural, tanto en España como en la Región de Murcia son escasas las acciones relativas a la estimación de los costes y los beneficios asociados a estos espacios.

Por tanto, todas las partes implicadas en la gestión de espacios verdes públicos deben de poner racionalidad a la hora de valorar estos espacios verdes urbanos y de dotar de recursos materiales y económicos a los mismos. Por ello, [1] afirma que “una gestión racionalizada exige a los responsables de la gestión municipal, técnicos y políticos, la elaboración de planes estratégicos de las ciudades, referidos a medio plazo” y que estos planes “deben elaborarse a partir de un diagnóstico estratégico que identifique una serie de elementos diferenciales que distingan a la ciudad”. Por tanto, para llevar a cabo un plan estratégico se hace necesario un diagnóstico estratégico, que este caso se basará en un análisis detallado de los costes en base a la calidad del mantenimiento y al tipo de jardín que se valora.

La valoración económica permite poner racionalidad a las decisiones que se tomen teniendo en cuenta toda la información disponible, tanto de costes como de beneficios, existiendo o no un mercado para el intercambio de estos bienes. En este sentido, [2] afirman que “la valoración económica de los espacios naturales hay que entenderla como un instrumento para la toma de decisiones por parte de las administraciones públicas relacionadas con su conservación”. En definitiva, la valoración de los atributos ambientales debe ser tomada en cuenta para garantizar una gestión sostenible de los recursos escasos, siendo esta relevante tanto desde el punto de vista de los beneficios como del de los costes.

En este contexto, el objetivo de este trabajo es estimar los costes de mantenimiento de un jardín singular. Para lograr este objetivo se realizará un trabajo de campo previo a la estimación de los costes. La zona de estudio es la ciudad de Cartagena, concretamente el Jardín Histórico El Huerto de las Bolas, que cuenta con más de 100 años de historia, la declaración de Bien de Interés Cultural en 2005 y un estilo arquitectónico singular. No es frecuente encontrar en la literatura valoraciones asociadas a parques o jardines, por lo que desde el punto de vista de la gestión de estos espacios, los resultados del trabajo proporcionarán información útil a los encargados de gestionar el jardín y para posteriores estudios de valoración de estos espacios.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología utilizada para el análisis de los costes de mantenimiento consiste en el cálculo de los costes totales de producción en base a diferentes ratios relacionados con las labores de conservación necesarias para un óptimo mantenimiento del jardín [1], los cuales son interpretados y adaptados por experiencia profesional para la tipología de este espacio verde urbano. Dichos costes pueden desglosarse en costes variables, generados en función de los inputs utilizados, y costes fijos que, independientemente del nivel de mantenimiento, no varían su cantidad [3]. Los datos que se han tenido en cuenta para la estimación de los costes se han obtenido en base a la configuración de la estructura de costes descrita en la metodología de [4].

2.1 Costes fijos

Los costes fijos están constituidos por el conjunto de factores que no se agotan en un solo proceso productivo y pueden ser utilizados en los periodos siguientes. Este concepto engloba los costes de adquisición y mantenimiento de maquinaria, vehículos, herramientas y pequeños

materiales, uniformes, EPIs y posibles gastos extras previstos. Para este cálculo se han tenido en cuenta tanto los costes de adquisición como las amortizaciones anuales en función de su vida útil y las horas de uso, y se han considerado precios de proveedores actuales y competentes en el sector para cada una de las partidas. Además, se ha realizado un inventario exhaustivo de los elementos vegetales contenidos dentro del perímetro que comprende este espacio verde urbano, con el objetivo de poder determinar las necesidades de inmovilizados y, por tanto, de los costes fijos derivados de los mismos.

2.2 Costes variables

Los costes variables comprenden los costes de los factores de producción consumidos durante el proceso productivo de duración anual. Este concepto engloba los costes de mano de obra y suministros (podas, tratamientos fitosanitarios, etc.). Para su cálculo, se han considerado precios de proveedores actuales y competentes en el sector para los suministros. En el caso de la mano de obra, se ha calculado una necesidad de recursos humanos para un clima Mediterráneo y una superficie de 3,9 ha, basados en las tipologías estándar de [1] que se muestran en la Tabla 1, por lo que se ha dimensionado su mantenimiento con 3,3 Unidades de Trabajo-Hombre (UTH), lo que supondrá un mantenimiento con 3 trabajadores a tiempo completo (1 Oficial y 2 Auxiliares jardineros) y 1 a tiempo parcial durante 4 meses (1 Peón jardinero de refuerzo para determinadas tareas estacionales). Se ha considerado un coste de este personal basado en las tablas salariales del convenio colectivo estatal de jardinería para el periodo 2015-2016. Además, también se ha utilizado el anteriormente mencionado inventario de los elementos vegetales para determinar las necesidades y, por tanto, los costes variables derivados de las mismas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este análisis del coste de mantenimiento de este espacio verde urbano podemos observarlos en la Tabla 2, en donde se puede observar que el coste total anual asciende a 162.689 €/año, de los cuales 24.109 €/año (~15 %) corresponden a los costes fijos y 105.173 €/año (~65 %) corresponden a costes variables que han sido dimensionados para la tipología del jardín y las labores a realizar en dicho jardín. Además, se ha añadido un 4% de costes oportunidad, lo que supone 964 €/año de interés del capital fijo y 4.207 €/año de interés de capital variable, así como aproximadamente el 17% de impuestos indirectos (del coste total anual), lo que supone 28.235 €/año del coste anual.

4. CONCLUSIONES

Como conclusión cabe destacar el coste de mantenimiento anual que requiere un Jardín Histórico como el que nos ocupa en este estudio es de 162.689 €/año, lo que supone un coste de mantenimiento anual por unidad de superficie de 4,2€/m² aproximadamente. Considerando un coste medio de mantenimiento anual por unidad de superficie de los espacios verdes urbano del Municipio de Cartagena de unos 5 €/m², este valor obtenido es un 17% menor que el medio. Pese a ello, es un valor razonable y está dentro de un coste lógico para cualquier jardín de dimensiones similares. Este coste, aunque está dentro de unos valores lógicos, puede explicarse atendiendo a que el 30% de la superficie total del jardín son pavimentos, tanto duros (enlosado, vivienda central B.I.C., almacenes, estructuras, etc.) como blandos (tierra compactada, caminos, etc.), cuyo mantenimiento es mucho menor que cualquier otra zona ajardinada.

Este análisis de costes puede ayudar a comprender como se destinan los recursos económicos en los distintos espacios verdes ajardinados y a poner en valor el beneficio que puede reportar a la sociedad, pudiendo servir como herramienta tanto a técnicos como encargados de la gestión de los recursos públicos en beneficio de la sociedad.

5. REFERENCIAS

- [1] Ros, S. (2006). La empresa de Jardinería y Paisajismo (Ed. Mundi-Prensa, Madrid).
- [2] Barberán, R., Egea, P., Pérez, L. (1997). Los costes sociales de la política de protección de la naturaleza. Aproximación metodológica a su estimación. Paper presented at: IX Encuentro de economía pública (Vigo, España)
- [3] Ballesteros, E. (1990) Principios de Economía de la Empresa (Alianza Universidad-Textos, Madrid).
- [4] Caballero, P., de Miguel, M. D., Juliá, J. F. (1992). Costes y Precios en Hortofruticultura (Ed. Mundi Prensa, Madrid).

Tabla 1. Ratios para el cálculo de las necesidades de recursos humanos según [1]

Clima Tipo de superficie	Atlántico (ha/UTH/año)	Continental (ha/UTH/año)	Mediterráneo (ha/UTH/año)
Zona Verde S < 1 ha	0,9-1	0,8-0,9	0,5-0,65
Zona Verde 1 < S < 3 ha	1-1,2	0,9-1	0,65-0,75
Zona Verde 3 < S < 10 ha	1,2-1,5	1-1,2	0,75-0,85
Zona Verde S > 10 ha	1,5-2	1,2-1,5	0,85-1

Tabla 2. Análisis de costes del mantenimiento del Jardín Histórico “El Huerto de las Bolas”

Costes fijos	
Costes de adquisición de maquinaria	10.961,15 €
Costes de explotación Vehículos y maquinaria	9.530,76 €
Herramientas y pequeños materiales	1.117,02 €
Uniformes y EPIS	1.500 €
Extras	1.000 €
Subtotal	24.108,93 €
Interés del capital fijo (4%)	964,36 €
Costes variables	
Mano de obra	60.346,03 €
Suministros	44.827,13 €
Subtotal	105.173,16 €
Interés del capital circulante (4%)	4.206,93€
TOTAL ANUAL (sin impuestos)	134.453,38 €
IMPUESTOS INDIRECTOS	21% 28.235,21 €
TOTAL ANUAL	162.688,59 €

Configuration and specifications of an unmanned aerial vehicle for precision viticulture

Configuración y especificaciones de un dron para viticultura de precisión

M. Erena*¹, S. García-Galiano²

¹ GIS and Remote Sensing Group, IMIDA, 30150, La Alberca, Murcia, Spain

² Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 52. 30203 Cartagena, Spain

Abstract

Unmanned Aerial Vehicles (UAVs) with multispectral sensors are increasingly attractive in geosciences for data capture and map updating at high spatial and temporal resolutions. These autonomously-flying systems can be equipped with different sensors, such as a multispectral camera and miniaturized sensor systems, for navigation, positioning, and mapping purposes. These systems can be used for data collection in precision viticulture. In this study, the efficiency of a light UAV system for data collection, processing, and map updating in small areas is evaluated by the generation of correlations between classification maps derived from remote sensing and production maps, based on the comparison of the indices derived from UAVs incorporating infrared sensors with those obtained by satellites (Sentinel IIA and Landsat 8). The results indicate that UAVs are a promising option for the characterization of vineyard plots with high spatial variability, despite the low vegetative coverage of these crops.

Keywords: UAV; calibration; multispectral; Sentinel IIA; Landsat 8.

Resumen

Los vehículos aéreos no tripulados (UAV) con sensores multiespectrales son cada vez más atractivos en ciencias de la tierra para la captura de datos y actualización de mapas con alta resolución espacial y temporal. Estos sistemas de vuelo autónomo pueden equiparse con diferentes tipos de sensores, tales como cámaras multiespectrales y sensores miniaturizados, para facilitar la navegación, el posicionamiento y la elaboración de mapas de alta resolución. Estos sistemas ya se están utilizando para la recolección de datos en la viticultura de precisión. En este estudio, se pretende evaluar la eficiencia de los estos vehículos para la recolección de datos, procesamiento y actualización de mapas en áreas pequeñas, así como su comparación con otros índices derivados de los satélites (Sentinel IIA y Landsat 8). Los resultados indican que los UAV son interesantes para la caracterización de las parcelas de viña con alta variabilidad espacial, a pesar de la baja cobertura vegetal de estos cultivos.

Palabras clave: UAV; calibración; multiespectral; Sentinel IIA; Landsat 8.

* E-mail: manuel.arena@carm.es

1. INTRODUCTION

This article presents a multiscale approach designed to obtain different vegetative parameters. The characterization of the spatial variability in water status across vineyards is a prerequisite for precision irrigation. In this work we used simultaneous unmanned aerial vehicle (UAV) and aircraft surveys and Landsat 8 and Sentinel II satellite images, acquired over vineyards in south-eastern Spain, to assess the capability of each system to represent the intra-vineyard vegetation patterns, to evaluate the similarities of images taken at different spatial resolutions, and to perform an evaluation that combines operational and economic factors. Particularly useful are aerial images in the thermal (TIRS) infrared [1] and near-infrared (NIR) spectrum [2]. UAVs with multispectral sensors are becoming increasingly attractive for data capturing and map updating at high spatial and temporal resolutions in viticulture. Airborne thermal and multispectral images have also been applied successfully to the detection of water stress at larger scales. The normalized canopy temperature [3] and photochemical reflectance index [4] were demonstrated to be the best indicators of early and advanced water stress.

The investigation was based on a set of aerial images recorded during the flights performed with a UAV system over a commercial vineyard plot in Jumilla and an experimental vineyard in Bullas (Murcia, Spain). Additionally, biophysical indices obtained with the UAV were compared with those obtained by processing Landsat 8 and Sentinel IIA images and using multispectral and thermal cameras on-board of an airplane. These tests show the preliminary results for the configuration of a UAV-based system to be used for practical applications in precision agriculture [5,6].

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Study site and data

Two vineyards, hereafter referred to as V1 (38°34'05''N, 1°21'14''E) and V2 (38°06'39''N, 1°40'59''E), were chosen as test sites in the Murcia Region (Spain). The vineyards have similar agronomic characteristics. The commercial vineyard plot is divided into four zones, according to their lithology and the age of the plantation on the plot.

In the commercial vineyard (V1), the Droning D650 UAV was used, which carried a stationary point-and-shoot camera, model Canon IXUS 125 HS with a Blue filter. The Canon camera acquires 16.1-megapixel images (Infrared, IR; Green, G; and Blue, B, bands) with 8-bit radiometric resolution. The UAV images were collected on June 26th 2015, T13:30Z to T13:55Z. The efficiency of a UAV system for data collection, processing, and map updating in small areas is evaluated using different indices like enhanced normalized difference vegetation ENDVI [7]. The aerial images were collected on June 26th 2015, T13:30Z to T13:55Z, using a six-band multispectral camera (model Tetracam mini-MCA-6) and FLIR thermal cameras on-board an airplane. The indices calculated are canopy temperature and PRI.

Two types of satellite images have been used: Sentinel IIA has an optical instrument payload that samples 13 spectral bands: four bands at 10 m spatial resolution, six bands at 20 m, and three bands at 60 m. These images were collected on July 6th 2015, at T11:03Z, using the spectral band numbers 2, 3, 4, and 8 (10 m) of the MSI sensor. Landsat 8 data products comply with all the standard Level-1 specifications: OLI multispectral bands 1-7, 9: 30 meters; OLI panchromatic band 8: 15 meters; TIRS bands 10-11: 100 meters; Orthorectified; 16-bit pixel value. These images were collected on July 7th 2015, at T17:25Z, using the OLI and TIRS sensors.

2.2 Image acquisition

The set of UAV aerial images was collected on June 26th 2015, T12:00Z - T13:30Z. The index obtained was ENDVI with a resolution of 10 cm (Fig. 1). The flight with the AV was performed with sensors, a 6-band multispectral imager (Tetracam, model mini-MCA), and a thermal camera (FLIR) a resolution of 50 cm. The images were collected on June 26th 2015, T12:00Z - T13:30Z (Fig. 2). The automatic IMIDA processing system generates agro-meteorological products from Landsat 8. Each Landsat 8 image received is processed to generate the following products covering Murcia (Fig. 3): radiance, reflectance, NDVI, land surface temperature-LST (B10 and B11), soil-adjusted vegetation index-SAVI, leaf area index-LAI, and air temperature-AT [8]. The description of the processing system and products is available on the website <http://idearm.imida.es/>.

3. RESULTS AND DISCUSSION

This paper first presents a camera system designed for georeferenced NIR orthophoto generation, which was reliably used on a UAV. The results obtained with the thermal camera on the AV highlight the great differences in water stress among the different plots of the farm, which condition the production - in terms of quantity and quality - of the vineyard.

This UAV platform is proposed as a tool that can meet the needs of precision viticulture in terms of remote sensing, being distinguished by the low cost, timeliness, and flexibility of the measurements, customization of the equipment, full automation of the flight plan, and high precision quality of the data acquired. The tests performed show that the UAV platform may provide a tool that can be implemented at the farm level, even for small businesses. For future research, the development of advanced UAV systems with thermal and spectral cameras (Flir-Tau/Tetracam mini-MCA) would allow water stress to be monitored plant by plant. Regarding the existing studies on the application of UAVs to plant monitoring, the UAV flight must be configured to achieve an optimal spatial resolution between 20 and 50 cm, adequate for precision viticulture [9].

4. CONCLUSIONS

The understanding of the intra-vineyard variability is a keystone to implement effective precision agriculture practices, especially in Mediterranean environments where the land-use patterns are highly fragmented and vineyards present high heterogeneity because of variability in the soil, morphology, and microclimate. Our study, based on the comparison of different remote sensing platforms, shows that different resolutions provide similar results in the case of vineyards characterized by pronounced vegetation gradients and large vegetation clusters. On the contrary, in vineyards characterized by low vegetation gradients and high vegetation patchiness, low-resolution images fail to represent intra-vineyard variability and its patterns. Furthermore, considering the peculiarity of the crop structure of vineyards, our work points out the impossibility of distinguishing the canopy and inter-rows in the case of low-resolution images. The cost analysis shows that, beyond technical aspects, an economic break-even between UAV and the other platforms exists between 1 and 30 ha of area coverage, and that aircraft remote sensing remains competitive with satellites above this threshold.

5. REFERENCES

[1] Suarez, L., Zarco-Tejada, P. J., Gonzalez-Dugo, V., Berni, J. A., Sagardoy, R., Morales, F., Fereres, E. (2010). Detecting water stress effects on fruit quality in orchards with time-series PRI airborne imagery. *Remote Sens. Environ* 114(2), 286-298.

- [2] Nebiker, S., Scherrer, M., Oesch, D. (2008). A light-weight multispectral sensor for micro UAV–opportunities for very high resolution airborne remote sensing. *Int. Arch. Photogramm. Remote Sens. Spat. Inf. Sci.* 37, 1193-2000.
- [3] Tanner, C. B (1963). Plant Temperatures. *Agron. J.* 55(2), 210-211.
- [4] Thenot, F., Methy, M., Winkel, T. (2002). The Photochemical Reflectance Index (PRI) as a water-stress index. *Int. J. Remote Sens.* 23(23), 5135-5139.
- [5] Matese, A., Primicerio, J., Di Gennaro, F., Fiorillo, E., Vaccari, F. P., Genesio L. (2013). Development and application of an autonomous and flexible unmanned aerial vehicle for precision viticulture. *Acta Hort.* 978, 63-69.
- [6] Matese, A., Di Gennaro, S. F. (2015). Technology in precision viticulture: A state of the art review. *Int. J. Wine Res.* 7(1), 69-81.
- [7] Matsushita, B., Yang, W., Chen, J., Onda, Y., Qiu, G. (2007). Sensitivity of the Enhanced Vegetation Index (EVI) and Normalized Difference Vegetation Index (NDVI) to Topographic Effects: A Case Study in High-density Cypress Forest. *Sensors* 7(11), 2636-2651.
- [8] Erena M., García, S. (2014). Diseño y puesta en marcha de una Infraestructura de Datos Espacial sobre Agricultura y Agua. Paper presented at: III Workshop en Investigación Agroalimentaria. (Cartagena, Spain, UPCT).
- [9] Primicerio, J., Matese, A., Di Gennaro, S. F., Albanese, L., Guidoni, S., Gay, P. (2013). Development of an integrated, low-cost and open-source system for precision viticulture: from UAV to WSN. Paper presented at: EFITA-WCCA-CIGR Conference “Sustainable Agriculture through ICT Innovation”. (Turin, Italy, EFITA).

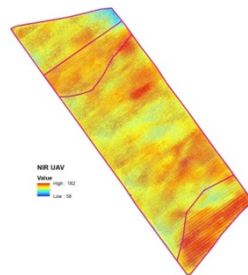


Figure 1. ENDVI 2015/06/26T1300Z (0.1m)

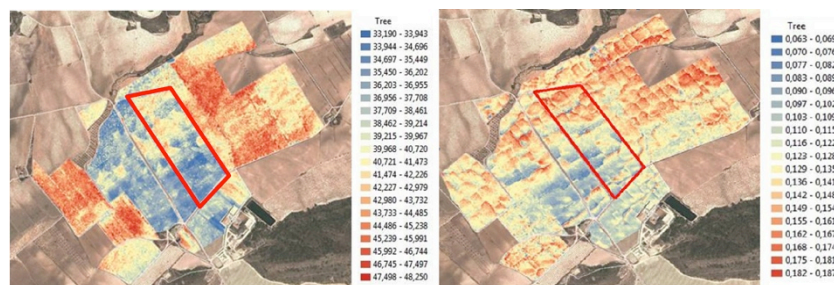


Figure 2. Canopy temperature (°C) and PRI index 2015/06/26T1330Z (0.5 m)

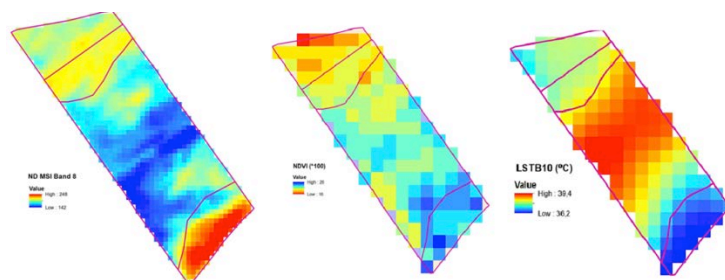


Figure 3. SII-MSI 2015/07/6:T11Z (10 m), NDVI, and L8 LSTB10 2015/07/09:T17Z (30 m).

Viability of an agro-climatic station with SCADA system and M2M communication

Viabilidad de una estación agroclimática con sistema SCADA y comunicación M2M.

J.M. González-Esquiva^{*1}, A. Ruiz-Canales², G. Garcia-Mateos³, J.M. Molina-Martínez¹

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

² Agua y Energía para una Agricultura Sostenible. Escuela Politécnica Superior de Orihuela. Universidad Miguel Hernández de Elche. Ctra. de Beniel, km 3.2, 03312. Orihuela. Alicante. Spain.

³ Dpto. de Informática y Sistemas, Facultad de Informática, 11 Campus de Espinardo, Universidad de Murcia, 30100 Murcia, Spain.

Abstract

With this researching we studied the viability of installing an agroclimatic station connected to the SCADA server through a M2M (Machine to Machine) card. The station should be able to process data per second, verifying the integrity and send the data to an external hosting through TCP / IP protocol in JSON, CSV or XML format, the application is made in PHP with the library CURL, which facilitates installation in a Cloud Computing service. The SCADA system will have management and monitoring data and statistical processing of data as the Weibull distribution and the ability to import data in CSV format for use in EXCEL.

Keyword: Arduino; cloud computing; PHP.

Resumen

Por medio de la presente investigación se ha estudiado la viabilidad de la instalación de una estación agroclimática conectada al servidor SCADA por medio de una tarjeta M2M (Machine to Machine). La estación deberá ser capaz de procesar los datos por segundo, verificando la integridad de los datos y enviar los datos a un hosting externo por medio de protocolo TCP/IP en formato JSON, CSV o XML, La aplicación está realizada en PHP con la librería CURL, lo que facilita su instalación en un servicio Cloud Computing. El sistema SCADA dispondrá de gestión y monitorización de datos, así como tratamiento estadístico de datos como la distribución de Weibull y la posibilidad de importación de datos en formato CSV, para su utilización en EXCEL.

Palabras clave: Arduino; cloud computing; PHP.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad podemos disponer de diferentes sistemas para implementar y diseñar un sistema SCADA en una estación agroclimática desde los robustos datalogger de CAMPBELL, los versátiles Raspberry o las potentes CRio (National Instruments) [1], aportando cada uno de ellos

* E-mail: jm.gonzalez@telenaturaebt.es

una configuración diferente y válidos, con funcionamientos altamente contrastados cuando coincide una conexión de banda ancha de internet, una alimentación de red eléctrica aceptables y con condiciones climatológicas poco severas, circunstancias que no se cumplen habitualmente en el campo, debido a que suelen ser zonas aisladas con baja cobertura y sin red eléctrica.

Para un diseño correcto de una estación agroclimática, debemos que tener en cuenta que consta de un sensor por cada fenómeno para monitorizar, que generan diversas señales analógicas dependiendo del fenómeno a medir y la naturaleza del mismo, por lo tanto es necesario un sistema flexible capaz de leer los diferentes datos transmitidos por cada sensor al microcontrolador de un autómatas o un datalogger, siendo necesario algunas veces la utilización de transductores para homogenizar y adaptar la señal para el sistema de control adoptado, ya sea por medio de una adaptación de señal analógica utilizando amplificadores instrumentales o bien utilizar sistemas de control con mayores prestaciones capaces de tomar datos independientemente de la señal teniendo como contrapartida equipos claramente sobredimensionados que encarecen el producto haciéndolo poco viable desde un punto de vista comercial.

Otra limitación en la construcción de estación agroclimáticas es que deberá tener un funcionamiento fiable a pesar de las condiciones adversas del campo, con temperaturas de trabajo cercanas a los 60 °C en el interior de las cajas de control, que desaconsejan la utilización de los sistemas Raspberry y habitualmente con una mala cobertura 3G que no posibilita la comunicación de banda ancha necesaria para la utilización de los sistemas SCADA embebidos, siendo preciso añadir un módulo de comunicación capaz de gestionar las colas de transmisión de datos de una forma fiable y segura, además de almacenar los datos de forma local en caso de un fallo de conexión[2].

Por medio del presente trabajo presentamos un novedoso sistema integral de una estación agroclimática con un módulo de comunicación M2M con almacenamiento de datos, utilizando el popular sistema Arduino, que posibilita gracias a la adaptación de módulos económicos la adecuación de señal de forma económica según las prestaciones establecidas, con la posibilidad de almacenamiento en tarjetas SD así como la comunicación en GSM, pudiéndose conectar con un hosting externo donde está alojado el sistema SCADA[3], por medio de la cuota de conexión más económica del mercado, la M2M. De esta forma, con este sistema solo se enviarán los datos precisos, reduciéndose de esta forma los requisitos de transmisión de datos y el procesador del sistema ya que los datos serán procesados en un servidor WEB externo, pudiendo acceder desde cualquier dispositivo con navegador WEB.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la comprobación del sistema se diseñó e instaló una estación agroclimática, alimentado por medio de una placa solar con acumulador que suministra la alimentación en continua, así mismo se deben disponer de ventiladores disipadores que se activan a temperaturas de trabajo superiores a los 40°C. Para la realización de un estudio comparativo, se consideraron los siguientes sensores tanto en su versión digital SDI-12 como en su versión analógica.

Sensor de temperatura y humedad Campbell HC253, que incorpora dos salidas lineales 0-1V para cada parámetro.

Piranómetro LP02 Hukseflux. Sensor lineal activo con un fondo de escala de 16 mV.

Anemoveleta Young 0510, que incluye dos salidas, una salida relacionada con la dirección del viento, construida en un potenciómetro lineal rotativo y por otra parte un generador eléctrico de 4 polos para indicarnos la intensidad del viento, que produce una señal alterna de amplitud y frecuencia variable con variación lineal.

Pluviómetro de pulsos 502202 Young, con un interruptor magnético normalmente abierto que realiza un contacto por cada ml de agua.

El estudio se realizó con sensores SDI-12 que tienen integradas la adecuación de señal, pudiéndose recoger los datos con facilidad con un datalogger CAMPBELL. Para la adquisición de datos se ha optado por un Arduino DUE, que dispone de un A/D de 12 bits con un umbral de tensión de 3,3V, con una resolución de 750 microvoltios que nos posibilita la adquisición de datos de forma directa de datos, sin necesidad de adecuación de las señales, tanto del sensor de temperatura y humedad, como la salida del potenciómetro de la Anemoveleta. Para la adquisición de datos relacionados con la intensidad de viento se necesita muestrear por flanco de subida de una señal analógica de frecuencia y amplitud variables, requiriéndose un adaptador de señal que facilite su lectura, optando por un módulo comercial para Arduino, que transforma la señal alterna en impulsos TTL por medio de un disparador de Schmitt, que es un comparador con histéresis que previene las interferencias provocadas por el ruido y rebotes de señal, pudiéndose cuantificar la señal TTL en una entrada digital del Arduino DUE, siendo este sistema más fiable y exacto que cuando se estudia la señal por amplitud, ya que estará sujeta a las interferencias y ruido que afectan de forma directa al tamaño de la onda circunstancia que no ocurre en el muestreo por frecuencia.

Por último, el piranómetro presenta un bajo fondo de escala (16mV) siendo necesario una adecuación de la señal por medio de un Amplificador Instrumental de alto precio o bien utilizar un módulo con el HX711 con un conversor de 24 bits con una librería específica para Arduino. El sistema SCADA está integrado en un servidor hosting con PHP y mySql externo, donde se podrán monitorizar los datos enviados desde la estación agroclimática en una base de datos para su control y monitorización desde cualquier dispositivo con navegador WEB, además de tener la posibilidad de importar los datos históricos del servidor, cálculo de variables dependientes así como los coeficientes de Weibull que parametrizan estadísticamente la distribución e intensidad del viento.

Para cumplir con la norma UNE 500540, 2004 se requerirá un muestreo de un dato por segundo de los diferentes parámetros, realizándose un promedio de los valores obtenidos por minuto con un filtro preciso que verifique que los datos obtenidos están entre los umbrales permitidos. Una vez procesados y verificados los datos, se establece una comunica por puerto serie con el módulo de comunicación desarrollado por TeleNatura EBT, capaz de almacenar los datos en una tarjeta SD y establecer la conexión con el servidor hosting por medio de la tarjeta de comunicación M2M. No se tuvo que realizar ninguna adecuación de señal, el sistema SCADA esta embebido en el sistema no requiriendo sistemas separados y posibilitando de forma sencilla la transmisión de datos a hosting externos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El sistema debido a las limitaciones de buffer del SDI-12, se obtenían tiempos de muestreo superiores a 1 segundo en algunas ocasiones, ya que se precisa una muestra por segundo, no cumpliendo la normativa UNE 500540,2004.

Los datos obtenidos por las dos estaciones agroclimáticas con sensores analógicos se ajustan a los parámetros establecidos, obteniéndose una media entre 3 y 5 datos por segundo, pudiéndose realizar una media de los datos y almacenarse en un archivo con un histórico de datos en formato JSON[4].

Ambos sistemas fueron capaces de funcionar con diversos parámetros de configuración, con ficheros de históricos por día y hora, enviando los datos de forma autónoma, pudiéndose importar los históricos recibidos de forma sencilla a la base de datos del sistema SCADA,

independientemente del tamaño de los ficheros generados, siendo monitorizados los datos en dispositivos con navegador web, Fig. 1.

A pesar de haber existido varios cortes de conexión de red, el sistema ha sido capaz de sincronizar y almacenar los datos en el comunicador de TeleNatura EBT, pudiéndose restablecer la conexión de forma autónoma y transmitir los datos con intervalos de conexión inferiores al segundo, vaciándose fácilmente la cola con datos pendientes de envío.

4. CONCLUSIONES

El sistema obtenido es una solución económica y fiable, que sustituye dataloggers o compact cRio por una tarjeta Arduino, cumpliendo perfectamente la norma UNE 500540, 2004, funcionando adecuadamente, presenta una opción mucho más económica al tener un coste el Arduino inferior a los 100 euros respecto a los sistemas C-RIO con precios más elevados dado sus altas prestaciones estando sobredimensionado el sistema. Aunque la opción de los sistemas SDI-12 con precio más económico que su versión analógica, cumplía perfectamente las especificaciones del sistema con los datalogger más económicos presento el inconveniente de una baja velocidad de muestreo, que no cumple la norma.

Por otra parte al sustituir los sistemas SCADA embebidos por servicios hosting se reduce el tráfico de datos, al no tener que generar y repetir el envío de datos a cada cliente, así como la interfaz, requiriendo de esta forma conexiones muy lentas, posibilitado utilizar las tarjetas M2M, abaratándose de esta forma los costes de mantenimiento respecto a otras tarjetas con contrato 3G mucho más caras. Las conclusiones deben ser concisas y claras y no ser una repetición de los resultados.

5. REFERENCIAS

- [1] Ramana, U.V., Prabhakar, T.V. (2005). Some Experiments with the Performance of LAMP Architecture. The Fifth International Conference on Computer and Information Technology (CIT'05), 916-20.
- [2] Castillo, J.A.M. (2016), Serialización/deserialización de objetos y transmisión de datos con JSON: una revisión de la literatura. Tecnología en Marcha, 29(1), 118-125.
- [3] Jiménez-Buendía, M., Ruiz-Peñalver, L., Vera-Repullo, J.A., Intrigliolo-Molina, D.S., Molina-Martínez, J.M. (2014). Development and Assessment of a Network of Water Meters and Rain Gauges for Determining the Water Balance. New SCADA Monitoring Software. Agric. Wat. Manag. 151, 93-112.
- [4] Keahey, K., Figueiredo, R., Fortes, J., Freeman, T., Tsugawa M.. (2008). Science Clouds : Early Experiences in Cloud Computing for Scientific Applications. Cloud computing and applications, 825-30.

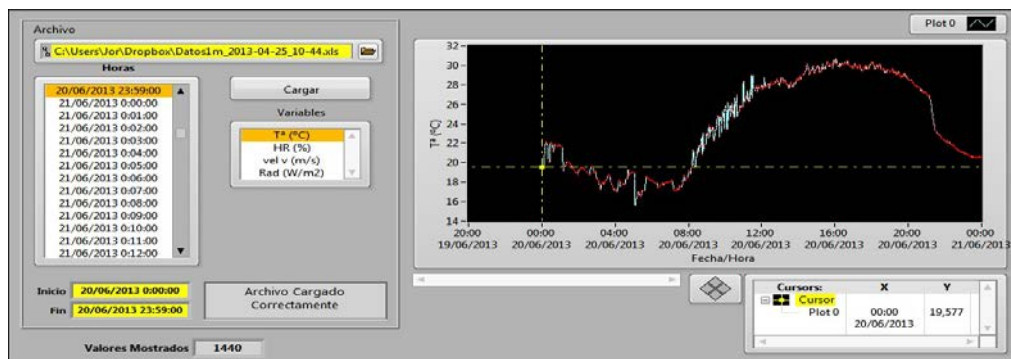


Figura 1. Monitorización de la estación agroclimática utilizando un navegador web.



POSTER SESSION I
Food Technology and
Engineering

Innovative development of green smoothies by emerging minimal processing technologies

Innovaciones en el desarrollo de smoothies verdes mediante tecnologías emergentes de procesado mínimo

N. Castillejo¹, F. Artés^{1,2}, F. Artés-Hernández^{1,2}

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

²Institute of Plant Biotechnology - IBV. UPCT. Campus Muralla del Mar s/n. 30202. Cartagena, Spain.

Abstract

Actual world life and current eating habits are the reasons why consumers demand healthy, nutritious, safe and eco-friendly ready to eat food. Therefore, fresh vegetables smoothies, rich in bioactive compounds can be attractive to the consumer to meet those needs, as a dietary supplement, quick and easy to consume. The market for fresh vegetables smoothies is still incipient and scientific information is very scarce, which is necessary to know the optimal parameters for proper conservation and commercial life as long as possible while preserving its quality and food safety. It is therefore essential to research, develop and innovation in order to explore new eco-friendly minimal processing techniques for keeping or increasing quality and safety as well as extend their marketing period.

Keywords: beverage; horticultural; quality; bioactive compounds; self-life.

Resumen

El ritmo de vida y los hábitos alimentarios actuales son las causas por las que los consumidores demandan alimentos sanos, nutritivos, seguros, respetuosos con el medio ambiente y listos para su consumo. Por ello los batidos de hortalizas frescas ricos en compuestos bioactivos pueden ser atractivos para el consumidor por satisfacer dichas necesidades, como un complemento en la dieta, rápido y fácil de consumir. El mercado de los batidos de hortalizas frescas es incipiente y no hay mucha información científica, la cual es necesaria para conocer los parámetros óptimos para una correcta conservación y una vida útil comercial lo más larga posible preservando su calidad y seguridad alimentaria. Por ello es imprescindible la investigación, desarrollo e innovación que estudie nuevas técnicas que mantengan o incrementen la calidad y seguridad, así como prolongar su comercialización.

Palabras clave: batidos; hortofrutícola; calidad; compuestos bioactivos; vida comercial.

* E-mail: noelia.castillejo@upct.es

1. INTRODUCCIÓN

Los batidos o “smoothies” a base de frutas y hortalizas frescas, se introdujeron por primera vez en EEUU hacia 1960 y han reemergido en el 2000 [1], debido a que la sociedad ha cambiado mucho sus hábitos de alimentación en las dos últimas décadas. El actual ritmo de vida, cada vez con menos tiempo disponible para preparar comidas equilibradas, ha provocado la demanda de productos vegetales naturales, frescos, saludables y listos para consumir [2,3]. La tendencia de los consumidores se está orientando hacia las bebidas listas para ingerir (“ready-to-drink”). Para aumentar el consumo de frutas y hortalizas, la industria alimentaria ofrece como una alternativa los batidos, que pueden contribuir a dicho suministro en especial a las personas que no pueden consumirlas debido a la no disponibilidad en el mercado y/o conveniencia. Un batido puede sustituir el valor nutricional de al menos una porción de frutas u hortalizas en función de su fabricación y composición [1].

El procesado mínimo de alimentos líquidos/pastosos o bombeables, como los batidos, tiene como objetivo mejorar o mantener la seguridad y la estabilidad del producto con respecto a una pasteurización convencional que pueda resultar agresiva para la calidad. Mediante un procesado térmico menos severo, se mantienen los atributos nutricionales y sensoriales del producto debido al menor impacto térmico [4,5].

Los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios así como las normas de aplicación que deben cumplir las Industrias Alimentarias al aplicar las medidas generales y específicas de higiene se recogen en la Directiva Europea, Regulation EC 1441/2007 [6]. La seguridad de los productos alimenticios se garantiza principalmente mediante un enfoque preventivo, con la adopción de buenas prácticas de manipulación e higiene del procesado y la aplicación de procedimientos basados en los principios de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC). Los batidos de frutas y hortalizas son susceptibles al crecimiento microbiano de especies que se adaptan bien a un medio ácido ($\text{pH} < 4$), tales como levaduras, hongos y bacterias ácido lácticas, debido a disponer de azúcares, otros nutrientes y un alto valor de actividad de agua (a_w) [7]. Por ello, es necesario pasteurizar mediante tratamientos térmicos entre 60 y 80 °C durante unos pocos minutos para eliminar un determinado patógeno o patógenos asociados al producto. Esta pasteurización suele ser una exigencia legal, como medida de salud pública, cuando un producto se ha mostrado como vehículo frecuente de enfermedad. El segundo motivo de que se pasteurice un alimento es para eliminar organismos causantes de alteración, prolongando de este modo su vida comercial [8]. El éxito de los batidos se basa esencialmente en su frescor y se debe evitar que la estabilización térmica afecte rasgos atractivos como el color [9] y sus propiedades funcionales [10,11]. Los tratamientos térmicos inadecuados pueden reducir el contenido fitoquímico de batidos en detrimento de las propiedades antioxidantes relacionadas.

Por cuanto antecede, el objetivo de esta Tesis consiste en desarrollar nuevas composiciones de batidos verdes a base de hortalizas frescas, ricos en compuestos antioxidantes, aplicando tratamientos térmicos suaves e innovadores para preservar la seguridad alimentaria y la calidad y conocer el efecto tiempo/temperatura durante la vida comercial del batido. Para evaluar la calidad se cuantificarán los principales atributos físico-químicos (pH , sólidos solubles totales, acidez titulable), microbiológicos, sensoriales y nutritivos bajo los tratamientos seleccionados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Estudios preliminares

La composición óptima del batido se determinará mediante análisis sensoriales en una sala de cata homologada, climatizada a 24 °C en el Instituto de Biotecnología Vegetal (IBV) de la

Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT), a través de un panel de laboratorio concedor del producto. Cada evaluador se ubicará en una de las 8 cabinas independientes de que se dispone, iluminada con luz de día (3350 Lm). Las muestras se presentarán de forma correlativa, siguiendo un diseño completamente aleatorio.

2.2 Material vegetal

Las hortalizas necesarias para preparar cada batido se obtendrán de industrias manipuladoras o de supermercados el día anterior a la realización de la experiencia y se trasladarán a las cámaras de refrigeración de la Planta Piloto del Área de Tecnología de Alimentos de la UPCT, donde serán refrigeradas antes del procesado.

2.3 Preparación del batido y aplicación de tratamientos

Las hortalizas a utilizar se limpiarán con agua de la red y 100 ppm de NaClO y se dispondrán en el formato adecuado para favorecer la homogeneización del batido. El material vegetal pesado se introducirá en un robot de cocina para su homogeneizado y tener de este modo el batido o smoothie. Se aplicarán tratamientos térmicos suaves variando el tiempo y la temperatura de aplicación para obtener unas condiciones lo menos agresivas posible a la calidad. Se utilizarán pasteurizadores convencionales, así como la tecnología de microondas. El objetivo será inactivar enzimas y posibles microorganismos alterantes y patógenos. El almacenamiento será en tubos Falcon de 50 ml o en envases flexibles a diferentes temperaturas durante su vida comercial.

2.4 Análisis y determinaciones

2.4.1 Atributos químicos: se realizarán medidas de sólidos solubles totales (refractómetro, °Brix), pH (pH-metro) y acidez titulable (titulador automático, mg de ácido cítrico 100 mL⁻¹).

2.4.2 Análisis microbiológico: se determinarán los microorganismos psicrófilos, mesófilos, enterobacterias, mohos y levaduras.

2.4.3 Análisis sensorial: Se analizarán los principales atributos de calidad sensorial como la apariencia visual, aroma, sabor, textura y aceptabilidad global. Además se evaluará la presencia de alteraciones de color, aroma, sabor, grumosidad, precipitaciones o separación de fases. Se utilizará una escala hedónica de 5 puntos en intensidad, donde 3 será el límite de consumo.

2.4.4 Compuestos bioactivos y otros análisis dependiendo de las hortalizas utilizadas: Vitamina C (HPLC), fenoles totales, capacidad antioxidante, carotenoides y clorofilas totales (espectrofotómetro) y glucosinolatos (UPLC).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados esperados son que los batidos tratados térmicamente de forma suave mantengan los compuestos nutricionales en comparación con el control tratado de forma convencional, más agresiva, y que la calidad sensorial se vea mejorada, evitando posibles pérdidas de color, aroma o sabor por la acción del calor. Se espera incluso que alguna tecnología de procesado emergente pueda inducir un mayor contenido de antioxidante debido al estrés sufrido por el producto.

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos se pretenden publicar en revistas de elevado índice de impacto para obtener los correspondientes indicios de calidad y finalizar de este modo la Tesis Doctoral

5. AGRADECIMIENTOS

Se agradece la financiación recibida del Ministerio de Economía y Competitividad, Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientada a los Retos de la Sociedad AGL2013-48830-C2-1-R, de SAKATA SEED IBÉRICA S.L.U. y a los fondos FEDER de la UE.

6. REFERENCIAS

- [1] Di Cagno, R., Minervini, G., Rizzello, C.G., De Angelis, M., Gobbetti, M. (2011). Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and Green smoothies. *Food Microbiol.* 28, 1062-1071.
- [2] Artés-Hernández, F., Aguayo, E., Gómez, P.A., Artés, F. (2009). Innovaciones Tecnológicas para preservar la calidad de los productos vegetales mínimamente procesados o de la “cuarta gama”. *Horticultura Internacional* 69, 52-57.
- [3] Rodríguez-Verástegui, L.L., Martínez-Hernández, G.B., Castillejo, N., Gómez, P.A., Artés, F., Artés-Hernández, F. (2016). Bioactive compounds and enzymatic activity of red vegetable smoothies during storage. *Food Bioprocess Technol.* 9, 137-146.
- [4] Walking-Ribeiro, M., Noci, F., Cronin, D.A., Lyng, J.G., Morgan, D.J. (2010). Shelf life and sensory attributes of a fruit smoothie-type beverage processed with moderate heat and pulsed electric fields. *Food Sci. Technol.* 43, 1067-1073.
- [5] Artés, F., Artés-Hernández, F. (2012). Innovaciones en técnicas de procesado para facilitar el consumo de hortalizas y frutas. *CTC. Revista de Agroalimentación e Industrias afines* 51, 9-15.
- [6] Regulation EC 1441/2007. (2007). Commission regulation on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union* 32, 12-29.
- [7] Tournas, V.H., Heeres, J., Burgess, L. (2006). Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food Microbiol.* 23, 684-688.
- [8] Adams, M.R., Moss, M.O. (1997). *Microbiología de los alimentos*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 469 pp.
- [9] Olsen, N.V., Menichelli, E., Grunert, K.G., Sonne, A.M., Szabó, E., Bánáti, D., Næs, T. (2011). Choice probability for apple juice based on novel processing techniques: investigating the choice relevance of mean-end-chains. *Food Quality Preference*, 22, 48-59.
- [10] Patras, A., Brunton, N.P., da Pieve, S., Butler, F. (2009). Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 10, 308-313.
- [11] Keenan, D.F., Rößle, C., Gormley, T.R., Butler, F., Brunton, N.P. (2012). Effect of high hydrostatic pressure and thermal processing on the nutritional quality and enzyme activity of fruit smoothies. *LWT – Food Sci. Technol.* 45, 50-57.

Puree-based vegetables beverages development under innovative minimal processing techniques

Desarrollo de purés a base de hortalizas mediante técnicas innovadoras de procesado mínimo

T. V. Klug*¹, F. Artés^{1,2}, F. Artés-Hernández^{1,2}

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

²Institute of Plant Biotechnology - IBV. UPCT. Campus Muralla del Mar s/n. 30202. Cartagena, Spain.

Abstract

Frequently consumers demand new healthy, safe and ready to use products. Therefore, based purees vegetables arise as interesting products in the food industry. Sensory and nutritional quality of these products must be paramount to have good consumer acceptance, preserving food security. Therefore, processing by less aggressive techniques, and eco-innovative, which preserve the quality of the raw material for an adequate shelf life is necessary in relation a conventional heat treatment. The aim will be to study the effect of high hydrostatic pressure, flow microwave system pasteurization and other alternative heating methods on the effect on sensory, nutritional and microbiological quality in puree-based vegetables beverages during shelf life.

Keywords: beverages; horticultural; high hydrostatic pressure; microwave; global quality.

Resumen

Los consumidores demandan asiduamente nuevos productos saludables, seguros y listos para su uso. Por ello, los purés a base de hortalizas surgen como productos interesantes en la industria alimentaria. La calidad sensorial y nutricional de estos productos debe ser máxima para tener una buena aceptación por el consumidor, preservando en todo momento su seguridad alimentaria. Por ello, es necesario el procesado mediante técnicas menos agresivas, y ecoinnovadoras, que preserven la calidad de la materia prima durante una adecuada vida útil, frente a un tratamiento térmico convencional. El objetivo será estudiar el efecto de la alta presión hidrostática, una pasteurización por microondas de flujo continuo y otros métodos alternativos de calentamiento sobre el efecto en la calidad sensorial, nutritiva y microbiológica en diversos purés a base de hortalizas durante su vida comercial.

Palabras clave: bebidas; vegetales; alta presión hidrostática; microondas; calidad global

* E-mail: tammilaklug@gmail.com

1. INTRODUCCIÓN

Estudios anteriores han demostrado la relación entre las propiedades saludables que proporciona el consumo de hortalizas con la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes, hipertensión, trastornos gastrointestinales, enfermedad suprarrenal y la reducción del colesterol LDL [1,2]. Actualmente hay un gran interés por los alimentos funcionales y saludables por los consumidores, además de prácticos e innovadores debido a su estilo de vida. Por esta razón el desarrollo de nuevos productos a base de hortalizas como purés sería un mercado interesante. Sin embargo, para la aceptación de estos productos por el consumidor, la calidad sensorial y nutricional debe ser mantenida, así como la garantía de su seguridad alimentaria [3]. El tratamiento térmico es el método convencional para aumentar la vida útil de productos a base de hortalizas, mediante la inactivación de microorganismos y de enzimas. Sin embargo, el procesado térmico puede afectar negativamente a la calidad sensorial y nutricional de estos productos [4].

Una tecnología innovadora que muestra un gran potencial para preservar la calidad de alimentos a base de hortalizas es la aplicación de alta presión hidrostática (APH) [5]. La APH se considera una alternativa a la tecnología de procesamiento térmico ya que induce efectos mínimos sobre las propiedades sensoriales y nutricionales por utilizar bajas temperaturas [6]. Además, la tecnología APH tiene la ventaja de producir alimentos con diferentes viscosidades [7]. Otra tecnología promisoría es el uso de microondas. El calentamiento de productos alimenticios mediante microondas de flujo continuo ha demostrado que mantiene o proporciona un mejor color y retención de nutrientes [8,9]. Por ello, el objetivo de esta Tesis es el desarrollo de productos a base de purés de hortalizas por medio de la aplicación de tratamientos innovadores de procesado mínimo para preservar la seguridad alimentaria y mantener la calidad nutritiva y sensorial de la materia prima durante el mayor tiempo posible de su vida útil.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Estudios preliminares

La composición óptima del puré a base de hortalizas se optimizará mediante análisis sensoriales, a través de un panel de laboratorio entrenado en una sala de catas homologada del Instituto de Biotecnología Vegetal (IBV) de la Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT).

2.2 Material vegetal

Las hortalizas para realizar el puré serán recolectadas el día anterior a la realización de la experiencia y se trasladarán a las cámaras refrigeradas de la Planta Piloto del IBV.

2.3 Preparación del puré y aplicación de tratamientos

Las hortalizas a utilizar se limpiarán con agua de la red y 100 ppm de NaClO. En el caso de las legumbres se pelarán previamente. El material vegetal será homogeneizado en una procesadora de alimentos (Robot Cook) para obtener un producto bajo la forma de puré. Se aplicarán tratamientos térmicos convencionales e innovadores (pasteurización, alta presión hidrostática, vapor, microondas en equipo semi-industrial continuo de vaivén, etc), con análisis previo de diferentes temperaturas, potencias y tiempos de exposición para seleccionar aquellos parámetros que mejor preserven el valor nutricional del alimento. Las muestras de purés serán envasadas en bolsas de polietileno a bajo vacío. Se almacenarán a 5°C, utilizando en todos los casos al menos 3 repeticiones por tratamiento y día de análisis. Las muestras se tomarán a diferentes intervalos durante su conservación para realizar las distintas determinaciones de calidad.

2.4 Análisis y determinaciones

2.4.1 *Análisis de vida útil del producto*: se realizarán análisis durante el experimento con la finalidad de determinar la vida útil del producto a diferentes temperaturas de conservación.

2.4.1.1. *Análisis de parámetros físico-químicos*: pH (pH-metro), sólidos solubles totales (refractómetro, °Brix), acidez titulable (tituladora automático, mg de ácido cítrico 100 mL⁻¹), viscosidad y color (Minolta CR-300 Series).

2.4.1.2. *Análisis microbiológico*: mesófilos, psicrófilos, enterobacterias, mohos y levaduras por métodos estándar de enumeración.

2.4.1.3 *Análisis sensorial*: se analizarán los principales atributos de calidad sensorial como el sabor, aroma, textura, consistencia, color y evaluación global, siendo la calidad sensorial un factor determinante en la vida útil del alimento. Se utilizará una escala hedónica de 5 puntos en intensidad, donde 3 será el límite de consumo. Los análisis se realizarán en una sala de catas estandarizada del IBV-UPCT.

2.4.2 *Análisis posteriores*: el material proveniente de cada uno de los experimentos se almacenará a -80 °C. Posteriormente, se realizarán los siguientes análisis: capacidad antioxidante, fenoles totales (espectrofotométrico); folatos, factores antinutricionales (HPLC); análisis de enzimas relacionadas al pardeamiento (polifenol oxidasa, catalasa y peroxidasa) y enzimas relacionadas a viscosidad (pectin metil esterasa y poligalacturonasa).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El principal resultado esperado es que los purés a base de hortalizas que sean tratados con tecnologías innovadoras, durante un procesado mínimo o menos agresivo con la calidad del producto, preserven los compuestos nutricionales y reduzcan los factores antinutricionales en comparación con tratamiento térmico convencional. Además, se espera que alguna tecnología innovadora pueda incluso mejorar / potenciar la calidad sensorial de los productos en relación a color y viscosidad durante su vida útil.

4. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos se pretende publicar en revistas de elevado índice de impacto para obtener los correspondientes indicios de calidad y poder finalizar la Tesis Doctoral.

5. AGRADECIMIENTOS

Se agradece la financiación recibida por parte del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientada a los Retos de la Sociedad AGL2013-48830-C2-1-R, a SAKATA SEEDS IBÉRICA, al Proyecto EUROLEGUME (EU FP7 Research Project No. 613781) de UE dentro del 7º Programa Marco de Investigación, Desarrollo Tecnológico y Diseminación y a los fondos FEDER. Se agradece especialmente la ayuda de la CNPq de Brasil por la beca de investigación concedida a Tâmmila V. Klug.

6. REFERENCIAS

[1] Tharanathan, R.N., Mahadevamma, S. (2003). Grain legumes - A boon to human nutrition. Trends Food Sci. Technol. 14, 507-518.

[2] Lima, A.I.G., Mota, J., Monteiro, S.A.V.S., Ferreira, R.M.S.B. (2016). Legume seeds and colorectal cancer revisited: Protease inhibitors reduce MMP-9 activity and colon cancer cell migration. Food Chem. 197, 30-38.

- [3] Castillejo N, Martínez-Hernández G.B., Gómez P.A., Artés F., Artés-Hernández F. (2016). Red fresh vegetables smoothies with extended shelf life as an innovative source of health-promoting compounds. *J. Food Sci. Technol.* In press. DOI: 10.1007/s13197-015-2143-2.
- [4] Rodríguez-Verástegui L.L., Martínez-Hernández G.B., Castillejo N., Gómez P.A., Artés F., Artés-Hernández F. (2016). Bioactive compounds and enzymatic activity of red vegetable smoothies during storage. *Food Bioprocess Technol.* 9, 137–146.
- [5] Sila, D. N., Duvetter, T., De Roeck, A., Verlent, I., Smout, C., Moates, G. K. (2008). Texture changes of processed fruits and vegetables: Potential use of high-pressure processing. *Trends Food Sci. Technol.* 19, 309–319.
- [6] Gonzalez-Cebrino, F., Durán, R., Delgado-Adámez, J., Contador, R., Bernabé, R.R. (2015). Impact of high pressure processing on color, bioactive compounds, polyphenol oxidase activity, and microbiological attributes of pumpkin puree. *Food Sci. Technol. Int.* 22, 235–245.
- [7] Álvarez, M.D., Fuentes, R., Olivares, M.D., Canet, W. (2014). Effects of high hydrostatic pressure on rheological and thermal properties of chickpea (*Cicer arietinum* L.) flour slurry and heat-induced paste. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 21, 12–23.
- [8] Coronel, P., Truong, V.D., Simunovic, J., Sandeep, K.P., Cartwright, G.D. (2005). Aseptic processing of sweet potato purees using a continuous flow microwave system. *J. Food Sci.* 70(9), 531–536.
- [9] Stratakos, A.C., Delgado-Pando, G., Patterson, M.F., Koidis, A. (2016). Industrial scale microwave processing of tomato juice using a novel continuous microwave system. *Food Chem.* 190. 622–628.

Functionality of a watermelon juice enriched with L-citrulline: technical development and effect *in vivo*

Funcionalidad de un zumo de sandía enriquecido en L-citrulina: desarrollo tecnológico y valoración de sus efectos *in vivo*

B. Fernández-Lobato^{*1,2}, A. Martínez-Sánchez¹, E. Aguayo¹

¹ Institute of Plant Biotechnology - IBV. UPCT. Campus Muralla del Mar s/n. 30202. Cartagena, Spain.

²Servicio de Farmacia. Hospital General Universitario Santa Lucía, Cartagena, Spain.

Abstract

Watermelon is a rich natural source of L-citrulline (CIT). This is a non-essential amino acid (aa) synthesized endogenously in the intestinal mucus. Recent research has attributed important health properties to CIT. This compound is a precursor of L-arginine, which is a substrate for endogenous production of nitric oxide (NO) linked with positive effects in sport performance. Moreover, CIT is a urea cycle intermediate which contributes to the removal of ammonium ions via conversion to urea. The accumulation of ammonia is a determining factor in muscle fatigue and decreased sport performance. The purpose of this study is to evaluate the influence of watermelon juice enriched in CIT in enhanced sport performance and/or post-exercise recovery in aerobic and anaerobic exercises. Thus, the Rating of Perceived Exertion (RPE) immediately after exercise and Delayed-onset Muscle Soreness (DOMS) immediately after, 24, 48 and 72 hours after exercise will be evaluated. Additionally, plasma concentrations of biochemical markers related to muscle damage during sport activity will be studied.

Keywords: Ergogenic aids; functional food; sport performance; muscle fatigue; nitric oxide.

Resumen

La sandía es una fuente natural rica en L-citrulina (CIT). Este aminoácido (aa) no esencial se sintetiza endógenamente en la mucosa intestinal. En los últimos años, CIT ha despertado un especial interés por ser precursor de la biosíntesis de L-arginina, sustrato para la producción endógena de óxido nítrico (NO) al cual se le ha atribuido un efecto positivo en el rendimiento deportivo. Además, es un aa intermediario metabólico del ciclo de la urea hepático que contribuye a la eliminación del ión amonio en forma de urea. La acumulación de amonio ha sido relacionada con la aparición de la fatiga muscular y, por ello, con la disminución del rendimiento deportivo. El objetivo de este estudio consiste en evaluar la influencia del zumo de sandía enriquecido o no en CIT en la mejora del rendimiento deportivo y recuperación posterior, tras la realización de ejercicios físicos tanto aeróbicos como anaeróbicos. Con este fin, se determinará la percepción subjetiva del esfuerzo realizado al finalizar el ejercicio y la percepción subjetiva del dolor muscular al finalizar el ejercicio y a las 24, 48 y 72 horas. Adicionalmente, se evaluarán las concentraciones plasmáticas de los marcadores bioquímicos relacionados con el daño muscular.

Palabras clave: Suplementos ergogénicos; alimento funcional; rendimiento deportivo; fatiga muscular; óxido nítrico.

* E-mail: babiferlo@gmail.com

1. INTRODUCCIÓN

En los años 80, nace en Japón el término de alimentos funcionales, introduciéndose así un nuevo concepto de alimentos, que se desarrollaron específicamente para mejorar la salud y reducir el riesgo de contraer enfermedades. La definición precisa recoge que un alimento puede considerarse funcional si se demuestra satisfactoriamente que ejerce un efecto beneficioso sobre una o más funciones selectivas del organismo, además de sus efectos nutritivos intrínsecos, de modo tal que resulte apropiado para mejorar el estado de salud y bienestar, reducir el riesgo de enfermedad, o ambas cosas [1]. Los alimentos funcionales deben seguir siendo alimentos, deben consumirse dentro de una dieta sana y equilibrada; y deben demostrar sus efectos en las mismas cantidades en las que normalmente se consumen en la dieta. Actualmente, la industria alimentaria comercializa un gran número de alimentos funcionales siendo el sector deportivo un posible nicho de mercado. En este contexto, el presente estudio evaluará el efecto del consumo de un zumo de sandía cuya funcionalidad residirá en la concentración de CIT. El nombre de CIT procede de la palabra latina para denominar a la sandía (*Citrullus vulgaris*), dicho compuesto se aisló por primera vez en 1930 [2]. La sandía es una fuente natural rica en CIT, su riqueza puede variar desde 0,7 hasta 6 g/kg de peso fresco, presentando una mayor cantidad la corteza respecto a la pulpa [3,4].

CIT es un aminoácido no esencial que se sintetiza endógenamente en la mucosa intestinal a partir de glutamina y otros aminoácidos derivados. Desde el enterocito se libera hacia la circulación sanguínea y posteriormente se metaboliza en riñón, de forma que el 83% de la citrulina plasmática se convierte en L-arginina [5], el cual es sustrato endotelial para la producción endógena de óxido nítrico (NO) mediante la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). NOS cataliza una reacción enzimática compleja, que a partir de L-arginina y oxígeno conduce a la formación de NO y CIT como subproducto [6]. En fisiología del deporte, se piensa que los suplementos de NO pueden ser una ayuda ergogénica para aumentar el rendimiento deportivo [7]. Este hecho se basa en la evidencia de que el NO es un importante modulador del flujo sanguíneo, del metabolismo de la energía muscular, y de la respiración mitocondrial durante el ejercicio físico [6].

Estudios clínicos en voluntarios humanos sanos [8,9], demostraron que al administrar suplementos de L-arginina y CIT, los suplementos de CIT fueron más eficaces para incrementar la concentración plasmática de arginina que la propia arginina. Los suplementos de L-arginina sólo presentan un 60% de biodisponibilidad, debido a que sufren un elevado metabolismo por las enzimas esterases del intestino delgado y del hígado. En cambio, la CIT no es metabolizada por estas enzimas. Además, dosis altas (dosis única > 10 g) de arginina u ornitina inducen efectos secundarios gastrointestinales mientras que CIT es bien tolerado incluso a dosis únicas altas >15 g. Este hecho puede explicarse a que arginina y ornitina, a elevadas dosis, producen una rápida saturación de su absorción intestinal, quedando atrapados en la luz intestinal sin ser absorbidos e inducen diarreas osmóticas, en cambio la absorción intestinal no es un factor limitante en la biodisponibilidad de CIT [10].

Otro aspecto interesante, es que la CIT al no ser un aminoácido proteico, no interviene en la síntesis de proteínas. CIT es un intermediario metabólico del ciclo de la urea, cuya función es la eliminación del excedente del ión amonio generado en la degradación de los aminoácidos y otros compuestos nitrogenados [2]. La utilización metabólica de las proteínas como fuente de energía para sustentar una actividad física intensa está limitada por la toxicidad del ión amonio y la necesidad de eliminarlo en forma de urea. Córdova et al. [11] demostraron que la suplementación con CIT a ciclistas semi-profesionales mejoraba el funcionamiento del ciclo de urea durante y después de un ejercicio físico intenso, facilitando la absorción energética de las proteínas; así como favoreciendo la síntesis de NO e incrementando la oxigenación del tejido hipóxico durante un periodo de tiempo prolongado.

Por otro lado, el ejercicio físico agudo produce rupturas de miofibrillas musculares provocando daño muscular. Este daño produce fatiga muscular que limita el rendimiento, disminuyendo la fuerza, el pico de potencia o la velocidad. La fatiga muscular es dependiente de la intensidad del esfuerzo y, en particular, del tipo de ejercicio físico realizado. Por tanto, la

valoración de marcadores bioquímicos relacionados con el daño muscular resulta de gran interés incluso para el control del entrenamiento, ya que además de aportarnos información de la utilización de ciertas rutas metabólicas también informan sobre la destrucción muscular durante la actividad deportiva y permite determinar el tipo de esfuerzo [12].

El objetivo principal de estos estudios *in vivo*, realizados en deportistas, se centra en evaluar la funcionalidad del zumo de sandía enriquecido en CIT, en el rendimiento físico y posterior recuperación, tras practicar una actividad deportiva intensa, tanto aeróbica como anaeróbica. Para abordar esta investigación se evaluarán parámetros deportivos y marcadores bioquímicos relacionados con el daño muscular.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Bebidas

Se evaluarán diferentes zumos de sandía, cuya diferencia residirá en la concentración de CIT. El enriquecimiento en CIT se realizará de forma exógena incorporándose en el zumo elaborado. Las diferentes dosis de CIT se establecerán en referencia a ensayos previos realizados por el grupo de investigación y referencias bibliográficas. Para la elaboración de los zumos se utilizará la variedad Fashion, por ser una de las variedades con mayor contenido en CIT. La pasteurización de los zumos y su posterior envasado en botellas individuales se realizará en condiciones industriales. Como placebo se utilizará una bebida de similares características sensoriales al del zumo de sandía, pero exenta de CIT.

2.2 Diseño del estudio con voluntarios

Cada experimento tendrá el diseño de un ensayo cruzado, aleatorio y doble ciego, existiendo tantos días de prueba como número de tratamientos, y distanciándose los días de prueba deportiva con tiempo suficiente para la recuperación del voluntario. El efecto del zumo sandía será evaluado tanto en pruebas deportivas aeróbicas como anaeróbicas. Se seleccionarán un mínimo de 20 voluntarios sanos, según los criterios de inclusión establecidos, que habitualmente practiquen el tipo de disciplina deportiva a evaluar. Todos ellos tendrán que manifestar su decisión de participar mediante consentimiento informado. En cada uno de los días de prueba, 1 ó 2 horas antes del ejercicio físico, cada voluntario ingerirá un tipo de bebida (placebo o zumo de sandía o zumo de sandía enriquecido en CIT). Se estudiará el rendimiento deportivo determinándose, en todos los voluntarios, la frecuencia cardiaca, la duración en realizar la prueba, el RPE y DOMS (tras el ejercicio y a las 24, 48 y 72 h). La RPE se determina mediante la "Escala de Esfuerzo Percibido de Borg" y el DOMS mediante una escala de dolor muscular con puntuación desde 1 (sin dolor) a 5 (dolor máximo con incapacidad física en un entrenamiento inmediato). Cada voluntario será sometido a varias analíticas sanguíneas: antes de las pruebas deportivas (nivel basal), inmediatamente después del ejercicio (post-ejercicio) y transcurridas 24, 48 y 72 horas de la finalización del ejercicio. En estas analíticas se evaluará la arginina, enzimas relacionadas con el daño muscular (aspartato-aminotransferasa, alanina-aminotransferasa, lactato deshidrogenasa, creatinquinasa), lactato, proteína C reactiva, creatinina, mioglobina y ferritina, urea, ácido úrico, colesterol y glucosa.

3. RESULTADOS ESPERADOS

Con los resultados obtenidos en cada una de las disciplinas deportivas, se pretende conocer la influencia de la CIT en el rendimiento deportivo y en la actividad metabólica, así como, averiguar la dosis mínima de CIT que permita la recuperación posterior del deportista.

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos se pretenden publicar en revistas de elevado índice de impacto para obtener los correspondientes indicios de calidad y finalizar de este modo la Tesis Doctoral.

5. AGRADECIMIENTOS

Se agradece a las empresas AMC Juices & Drink y a la Asociación Grupo Fashion (AGF) la colaboración recibida para realizar estos estudios.

6. REFERENCIAS

- [1] Ozen, A.E., Pons, A., Tur, J.A. (2012). Worldwide consumption of functional foods: a systematic review. *Nutr. Rev.* 70(8), 472-481.
- [2] Curis, E., Nicolis, I., Moinard, C., Osowska, S., Zerrouk, N., Bénazeth, S., Cynober, L. (2005). Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids* 29, 177-205.
- [3] Mandel, H., Levy, N., Izkovitch, S., Korman, S. H. (2005). Elevated plasma citrulline and arginine due to consumption of *Citrullus vulgaris* (watermelon). *J. Inherit. Metab. Dis.* 28, 467-472.
- [4] Tarazona-Díaz, M.P, Alacid, F., Carrasco, M., Martínez, I., Aguayo, E. (2013). Watermelon juice: a potential functional drink for enhancing anaerobic performance and relieve muscle soreness in athletes. *J. Food Chem.* 61, 7522-7528.
- [5] Blasco-Alonso, J., Sánchez-Yáñez, P., Rosa Camacho, V., Camacho Alonso, J. M., Yahyaoui Macías, R., Gil-Gómez, R., & Milano Manso, G. (2015). La cinética de la citrulina y la arginina y su valor como factor pronóstico en pacientes pediátricos críticamente enfermos. *Anales de Pediatría* 83(4), 257-263.
- [6] Suzuki, T., Morita, M., Kobayashi, Y., Kamimura, A. (2016). Oral L-citrulline supplementation enhances cycling time trial performance in healthy trained men: Double-blind randomized placebo-controlled 2-way crossover study. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 13, 1-8.
- [7] Bescós, R., Sureda, A., Tur, J. A., Pons, A. (2012). The effect of Nitric-Oxide-Related Supplements on human performance. *Sports Med.* 42(2), 99-117.
- [8] Hickner, R.C., Tanner, C.J., Evans, C.A., Clar, P.D., Haddock, A., Fortune, C., Geddis, H., Waugh, W., Mccammon, M. (2006). L-Citrulline reduces time to exhaustion and insulin response to a graded exercise test. *Med. Sci. Sport Exer.* 38, 660-666.
- [9] Schwedhelm, E., Maas, R., Freese, R., Jung, D., Lukacs, Z., Jambrecina, A., Spickler, W., Schulze, F., Böger, R.H. (2008). Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: impact on nitric oxide metabolism. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 65, 51-59.
- [10] Moinard, C., Nicolis, I., Neveux, N., Darquy, S., Benazeth, S., Cynober, L. (2008). Dose-ranging effects of citrulline administration on plasma amino acids and hormonal patterns in healthy subjects: the Citrudose pharmacokinetic study. *Br J Nutr.* 2. 99, 855-886.
- [11] Córdova, A., Sureda, A., Tauler, P., Ferrer, M.D., Villa, G., Tur, J.A., Pons, A. (2005). Efectos de la citrulina sobre la producción de óxido nítrico y la eliminación del nitrógeno de las proteínas durante una actividad física intensa. *Arch. Med. Deporte* 22, 497-498.
- [12] Urdampilleta, A., Martínez-Sanz, J.M., López-Grueso, R. (2013). Valoración bioquímica del entrenamiento: herramienta para el dietista-nutricionista deportivo. *Rev. Esp. Nutr. Hum. Diet.* 17, 73-83.

Effect of different technologies (conventional thermal treatment, microwave...) and stress conditions (acid shock) on *Listeria monocytogenes* in food

Efecto de diferentes tecnologías (tratamiento térmico convencional, microondas,...) y condiciones de estrés (choque ácido) sobre *Listeria monocytogenes* en alimentos

J.A. Sotomayor*, A. Iguaz, P.M. Periago^{1,2}

¹Departamento de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Campus de Excelencia Internacional Regional, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, Cartagena, Murcia, Spain.

²Instituto de Biotecnología Vegetal, Campus de Excelencia Internacional Regional Campus Mare Nostrum. Universidad Politécnica de Cartagena, Spain.

Abstract

Microorganisms have the ability to develop adaptive responses when they are subjected to sublethal conditions, triggering general defense mechanisms which are capable to increase resistance to this and other stresses, among those it's can be found the different methods of food preservation. Among the methods of bacterial inactivation at the industrial level, conventional thermal treatments present many advantages and is one of the most widely used. However, microwave processing, although has also several advantages is not so high employed. Therefore, the present project aims at determining the effect of different stressing conditions like acid shock as well as the effect of the heating medium pH on the inactivation and sublethal damage of *Listeria monocytogenes* treated with technologies such as conventional thermal and microwaves treatments, among others, in food.

Keywords: Sublethal damage; microbial inactivation; heat resistance.

Resumen

Los microorganismos poseen capacidad de desarrollar respuestas de carácter adaptativo cuando han sido sometidos a condiciones subletales, activando mecanismos generales de defensa capaces de provocar un aumento en su resistencia a éste y otros estreses, entre los que se encuentran los diferentes métodos de conservación de alimentos. Entre los métodos de inactivación bacteriana a nivel industrial, el tratamiento térmico convencional presenta numerosas ventajas y es uno de los más extensamente utilizados. Sin embargo, el procesado con microondas tiene también ventajas y no es tan empleado. Por lo tanto, el presente proyecto tiene como objetivos la determinación del efecto de diferentes condiciones de estrés, como un choque ácido, así como el efecto del pH del medio de calentamiento sobre la inactivación y daño subletal de *Listeria monocytogenes* sometida a tecnologías como un tratamiento térmico convencional y tratamiento por microondas, entre otros, en alimento.

Palabras clave: Daño subletal; inactivación microbiana; resistencia al calor

* E-mail: Jasb1@alu.upct.es

1. INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes es un microorganismo patógeno, bacilo Gram-positivo, aerobio, anaerobio facultativo y catalasa positivo. La enfermedad causada por la infección, conocida como listeriosis, presenta como síntomas diarrea, fiebre y dolor muscular. Si no se trata, puede desencadenar en septicemia y daño del sistema nervioso central (encefalitis, meningoencefalitis) [1]. Los alimentos epidemiológicamente relacionados con los brotes de infección por *L. monocytogenes* son salchichas, fiambres, leche, leche pasteurizada, derivados lácteos, carne y productos cárnicos y, debido a su presencia en aguas contaminadas, puede encontrarse en vegetales regados con agua no tratada [2]. La presencia de este microorganismo en los alimentos es debida, en parte, a su habilidad de tolerar condiciones ambientales extremas (e.j. altas concentraciones de sal, amplio rango de pH y temperaturas y baja actividad de agua) [3].

Durante muchos años de investigación microbiológica, numerosos son los estudios que demuestran que cuando determinados microorganismos son expuestos, durante un tiempo predeterminado, a una situación adversa (estresante), son capaces de sobrevivir, posteriormente, a una situación letal [4]. Ferrerira y colaboradores [5] observaron que tras la exposición de *Listeria monocytogenes* a un pH ácido, el microorganismo incrementó su resistencia al fluido gástrico, demostrando que la exposición previa a una condición estresante, pero no letal, puede resultar en una adaptación y desarrollo de mecanismos que le permiten sobrevivir a condiciones letales. Este fenómeno es conocido como adaptación al estrés, descrito comúnmente como un aumento de la resistencia de un microorganismo a factores realmente letales tras una leve exposición a una situación de estrés [4].

Pero, no sólo presentan la capacidad de desarrollar un incremento contra esa situación letal, sino también frente a otros agentes estresantes, entre los que se encontrarían los diferentes métodos de conservación de alimentos. Se ha observado que la inducción de la tolerancia a un determinado tipo de estrés, conlleva la tolerancia a otros tipos de estrés, aunque éstos sean letales en ausencia de una inducción previa (resistencia cruzada) [6, 7]. Por esa razón, es necesario investigar en las respuestas adaptativas a diferentes condiciones de conservación individualmente y en conjunto para poder determinar la aplicación adecuada de los factores de conservación [8].

Listeria monocytogenes es capaz de expresar proteínas del choque térmico cuando desarrolla resistencias subletales al calor, aunque este mecanismo continúa sin esclarecerse totalmente para este microorganismo [9]. Son muchos los factores que influyen en la resistencia al calor de *Listeria monocytogenes*, como serían el tipo de cepa, las condiciones de crecimiento previas, exposiciones previas a otros estreses, tipo de alimento en el que se encuentre, el diseño experimental llevado a cabo, entre otros.

El principal objetivo de cualquier proceso de conservación es minimizar el crecimiento de microorganismos alterantes y patógenos. Por lo tanto, las investigaciones de hoy en día están encaminadas hacia la búsqueda de técnicas que cada vez garanticen más la calidad y seguridad alimentaria con la mínima alteración de las cualidades nutritivas y organolépticas del producto.

Durante las últimas décadas, una gran variedad de tecnologías han sido investigadas como métodos de inactivación de agentes patógenos presentes en los alimentos. Entre estas tecnologías, se encuentra el tratamiento térmico convencional y por microondas. El calentamiento por microondas tiene lugar como resultado de la fricción molecular entre las moléculas de agua presentes en el alimento, bajo un campo eléctrico oscilante a una frecuencia específica [10].

En los últimos años, el uso del calentamiento por microondas para mejorar la seguridad microbiológica de los alimentos ha sido probado con éxito en varios productos alimenticios de

origen animal y vegetal. La tecnología de microondas se ha utilizado en el procesado de alimentos durante varias décadas, como en el secado, la descongelación y la esterilización, entre otros [11].

Por lo tanto, el presente proyecto de tesis doctoral tiene como objetivos la determinación del efecto de distintas condiciones de estrés (como un choque ácido, ...) sobre la inactivación y daño subletal de *Listeria monocytogenes* sometida a tratamientos por diferentes tecnologías como un térmico convencional y por microondas, entre otros, en alimentos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Microorganismo

Los microorganismos que serán usado en este estudio serán patógenos alimentarios como *Listeria monocytogenes*, entre otros, proporcionados por Colecciones de Cultivo como la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España). Las cepas serán almacenadas a - 80 °C (20% glicerol) hasta su uso. Para los experimentos de crecimiento y supervivencia, se prepararan medios de cultivo apropiados como el caldo tripticasa de soja (TSB).

2.2 Aplicación de un choque ácido y otras condiciones de estrés

Se aplicarán choques ácidos siguiendo la metodología especificada por Sotomayor Ballesta [12] y otros tipos de estreses.

2.3. Determinación de la termorresistencia/inactivación de *L. monocytogenes*

2.3.1 Tratamiento térmico convencional

La determinación de la termorresistencia del microorganismo se llevará a cabo en un termorresistómetro Mastia [13]. Los tratamientos térmicos se llevaran a cabo a diferentes temperaturas, en diferentes medios de calentamiento, a diferentes pHs, en alimentos (ácidos y neutros) y bajo diferentes condiciones (isotermas y no-isotermas).

2.3.1 Tratamiento por microondas

Se utilizarán equipos de microondas del grupo GEM del Laboratorio de Electromagnetismo y Materia (Edificio ELDI - UPCT) provistos de sensores de fibra óptica que registran la temperatura que se está alcanzando en diferentes puntos de la muestra.

2.4. Determinación del daño subletal

Para detectar los daños de las envolturas celulares se utilizará la técnica del medio selectivo. Tras los tratamientos, las células se cultivarán en un medio no selectivo y otro selectivo, estimando el porcentaje de células dañadas por comparación de la fracción de supervivientes en ambos medios. Como medio selectivo se utilizará TSA, conteniendo la concentración máxima no inhibitoria de cloruro sódico.

3. RESULTADOS

Con el trabajo a llevar a cabo para el desarrollo de esta tesis doctoral se pretende alcanzar la optimización de tratamientos de diferentes tecnologías, como el calentamiento convencional y por microondas, teniendo en cuenta distintas condiciones de estrés y tratamiento, para garantizar la seguridad microbiológica minimizando la alteración de la calidad organoléptica y nutricional del producto tratado.

4. CONCLUSIONES

El presente estudio pretende avanzar en la investigación sobre la validación de tratamientos térmicos suaves para la conservación de alimentos: el establecimiento de la seguridad microbiológica.

5. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación está siendo posible gracias al apoyo financiero proporcionado por el Ministerio de Economía y Competitividad, a través del proyecto AGL-2013- 48993-C2-1-R.

6. REFERENCIAS

- [1] Food and Drug Administration (FDA). (2003). Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Online. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>.
- [2] Guevara, L., Antolinos, V., Palop, A., Periago P. M. (2015). Impact of moderate heat, carvacrol, and thymol treatments on the viability, injury, and stress response of *Listeria monocytogenes*. BioMed Research Investigation, 1-10.
- [3] Gandhi, M., Chikindas, M.L. (2007). Review: Listeria: a food borne pathogen that knows how to survive. Int. J. Food Microbiol. 113, 1–15.
- [4] Ahmed, E., Vijay, K. (2002). Basics of stress adaptation and implications in new-generation foods. En: Microbial Stress Adaptation and Food Safety, 1st ed, A. E. Yousef, V.K. Juneja, eds. (CRC Press Taylor & Francis Group), p. 1–31.
- [5] Ferreira, A., O'Byrne, C.P., Boor, K.J. (2001). Role of sigma (B) in heat, ethanol, acid, an oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 67, 4454–4457.
- [6] Hill, C., Cotter, P. D., Sleator, R. D., Gahan, C. G. M. (2002). Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. Int. Dairy J. 12, 273–283.
- [7] Van Schaik, W., Van der Voort, M., Molenaar, D., Moezelaar, R., De Vos, W. M., Abee, T. (2007). Identification of the σ B Regulon of *Bacillus cereus* and Conservation of σ B-Regulated Genes in Low-GC-Content Gram-Positive Bacteria. J. Bacteriol. 12, 4384–4390.
- [8] Abee, T., Wouters, J.A. (1999). Microbial stress response in minimal processing. Int. J. Food Microbiol. 50, 65–91.
- [9] Sergelidis, D., Abraham, A. (2009). Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to heat and its impact on food safety. Food Control 20, 1-10.
- [10] Pucciarelli, A. B., F. O. Benassi (2005). Inactivation of *Salmonella enteritidis* on raw poultry using microwave heating. Braz. Arch. Biol. Techn. 48, 939–945.
- [11] Huang Y., Nandini K.E., Lakshmi M.C., Subramanian R. (2007). Effect of enzyme inactivation by microwave and oven heating on preservation quality of green tea. J. Food Eng. 78, 687–692.
- [12] Sotomayor Ballesta, J.A. (2015). Efecto de un choque ácido y del pH del medio de calentamiento sobre la termorresistencia de *L. monocytogenes*. Proyecto fin de Máster. Universidad Politécnica de Cartagena, Departamento de Ingeniería de los Alimentos y del Equipamiento Agrícola. Cartagena, España.
- [13] Conesa, R., Andreu, S., Fernández, P.S., Esnoz, A., Palop, A. (2009). Nosisothermal heat resistance determinations with the thermoresistometer Mastia. J. Appl Microbiol. 107, 506–513.



POSTER SESSION II
Agrifood Biotechnology

Genetic and molecular analysis of *Gigantea*, a gene involved in adaptation to climate via regulation of the circadian clock in *Solanaceae*

Análisis genético y molecular de *Gigantea*, un gen implicado en la adaptación al clima a través de la regulación del reloj circadiano en *Solanáceas*

C. Brandoli*¹, J. Weiss², M. Egea-Cortines²

¹ IBV, Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, Campus Muralla del Mar, Murcia, Spain

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

Abstract

The metabolism, physiology, and also the behaviour of most living beings, profoundly changes between day and night. These biological oscillations happen due to the circadian rhythm, an endogenous clock that regulates most of biological events. In the plant kingdom, one of the genes involved in this important regulation is *Gigantea*. Although discovered in the past century, some of its functions, at the molecular level, are unclear and still a source of intense scientific research. In this thesis project we will try to analyze phenotypic and biochemical changes induced by gene silencing in *Solanaceae* with the aim to better understand the function of *Gigantea*.

Keywords: *Gigantea*; recombinant plasmid; gene silencing; RNA interference; CRISPR/Cas9 System.

Resumen

El metabolismo, fisiología y comportamiento de los organismos vivos cambia entre el día y la noche. Estas oscilaciones biológicas se deben al reloj circadiano, un sistema endógeno que regula la mayoría de los procesos biológicos. En el reino vegetal, uno de los genes involucrados en esta regulación es *Gigantea*. Aunque fue descubierto en los años 50, sus funciones biológicas y moleculares no se conocen con detalle y son objeto de intenso trabajo debido a su importancia en la adaptación. En este proyecto de tesis pretendemos analizar cambios fenotípicos y bioquímicos relacionados con el silenciamiento de *Gigantea* en solanáceas.

Palabras clave: *Gigantea*; plásmido recombinante; silenciamiento génico; ARN de interferencia; Sistema CRISPR/Cas9

* E-mail: claudio.brandoli@gmail.com

1. INTRODUCTION

In the last decades, the scientific community has used *Arabidopsis thaliana* as a model system for identifying genes and determining their functions, as it has many advantages for genome analysis, including a short generation time, small size, large number of offspring, and a relatively small nuclear genome [1].

In more recent years, some genes involved in the regulation of circadian rhythm have been identified in *Arabidopsis*. One of these is *Gigantea*, a gene involved in flowering time regulation, light signalling, hypocotyl elongation, control of circadian rhythm, sucrose signalling, starch accumulation, chlorophyll accumulation, transpiration, herbicide tolerance, cold tolerance, drought tolerance, and *miRNA* processing [3]. It's therefore easy to understand why we chose to analyze the molecular pathway of this very important gene.

The following thesis project has different objectives related to the genetic regulation of *Gigantea* in plant crops. Between these, the phenotypic and biochemical analysis of petunia, an important ornamental plant.

Another objective, linked to the first one, is to silence the *Gigantea* gene through the use of two methods, an RNA of interference and a more recent method, called CRISPR/Cas9, in order to compare and analyze the mutant phenotype with its respective wild type form.

Finally, we obtained transposon-tagged alleles of the genes *Gigantea1* and *Gigantea2* as we found that the gene *Gigantea* is duplicated in *Solanaceae*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Analysis and identification of a transposable element in G11 and G12.

The first goal of this project that we want to achieve, is to get a plant that will bear in homozygous form a transposon, in the genes *Gigantea1* and *Gigantea2*.

We received from the Laboratoire de Reproduction et Développement des Plantes of the Ecole Normale Supérieure de Lyon (ENSL) two lines with transposon insertions *PhGi1::3087dTPH1* and *PhGi2::2995dTPH1* [4]. Hybrid plants were obtained by crossing Mitchell and Lion plants. After having catalogued every plant, we extracted and amplified the DNA from one leaf of each sample, then, we selected the plants carrying the transposon in heterozygous form thanks to a DNA analysis by electrophoresis on agarose gel (see Figure 1).

The plants proved to be in heterozygous form, were self-pollinated in order to obtain a segregation of type 1:2:1 in the second generation, with the aim to select again, only the homozygous forms.

2.2 Selective gene silencing through an interference RNA

We started selecting a region of the cDNA coding for *G11* and *G12* that would discriminate between both paralogs. We amplified a DNA fragment by PCR through the use of site-specific primers. This fragment was inserted into a gene vector called pDONR 201 and recombined into pHELLSGATE12 to obtain hairpin-like structures (see Figure 2).

Transgenic plants will be produced with the specific silencing of *G11* and *G12*.

2.3 CRISPR/Cas9 System

It is a new and innovative method for genome editing, enabling the precise manipulation of specific genomic sequences. This new technology relies on one sequence-specific nuclease called Cas9, used to generate double strand breaks at any desired location in the genome, thanks to a single guide RNA (sgRNAs) which “leads” the nuclease to the target sequence (see Figure 3).

As illustrate in Figure 3, some of the possible applications are (1) simultaneous target mutagenesis at multiple loci, (2) targeted chromosomal deletion, (3) synergistic or tunable deletion of a gene of interest, (4) synergistic or tunable repression of a gene of interest, (5) simultaneous activation of multiples genes and (6) simultaneous repression of multiples genes [2].

3. Acknowledgments

I would like to thank the Institute of Plant Biotechnology (IBV), especially my director and co-director of thesis, Dr. Julia Rosl Weiss and Dr. Marcos Egea Gutiérrez-Cortines for their willingness and their valuable advice. This works is part of projects BFU-2013-45148-R and Seneca 19398/PI/14

4. REFERENCES

- [1] Arabidopsis, T., & Initiative, G. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*, 408(December).
- [2] Lowder, L. G., Zhang, D., Baltes, N. J., Iii, J. W. P., Tang, X., Zheng, X., ... L, N. C. L. G. (2015). A CRISPR / Cas9 Toolbox for Multiplexed Plant Genome Editing and Transcriptional Regulation 1 [OPEN], 169(October), 971–985. <http://doi.org/10.1104/pp.15.00636>
- [3] Mishra, P., & Panigrahi, K. C. (2015). GIGANTEA – an emerging story, 6(January), 1–15. <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00008>
- [4] Van den Broeck, D., Maes, T., Sauer, M., Zethof, J., De Keukeleire, P., D’hauw, M.,... Gerats, T. (1998). Transposon Display identifies individual transposable elements in high copy number lines. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 13(1), 121–9. doi:10.1046/j.1365-3113.1998.00004.x

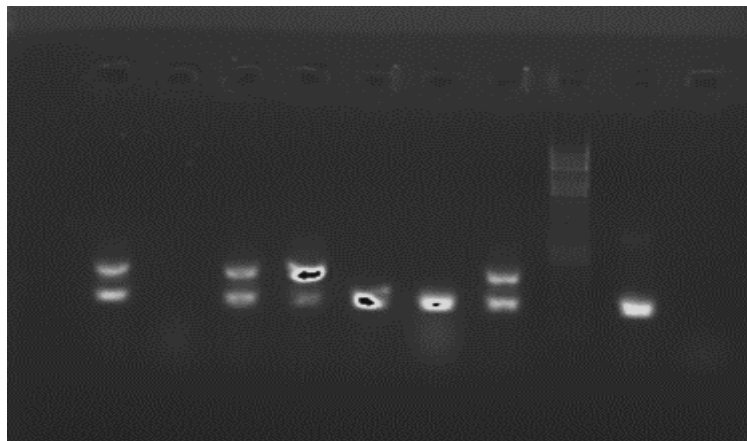


Figure 1. Identification of heterozygous forms in 7 different samples of plants, agarose gel 1%

Peach breeding (*Prunus persica* L.): Agronomic evaluation of selections IMIDA - NOVAMED

Mejora genética de Melocotonero (*Prunus persica* L.): Evaluación agronómica de selecciones 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. Spain

Abstract

Spain is the leading exporter of peach worldwide offering a wide range of varieties and typologies of fruit that cover a long period of harvest. Dependence on foreign varieties, limited access to many of them, royalty payments and problems of adaptation to different growing areas has made that appear in Spain in the last 20 years more than 10 breeding programs, private, public and public-private. IMIDA is developing a public-private peach breeding program with the company NOVAMED SL to improve the diversification in harvest and flowering time, productivity, chilling requirements, adaptation to different growing conditions Murcia, type of fruit and organoleptic characteristics. The general objective of this study is the agronomic, morphological and genetic characterization of the IMIDA-NOVAMED program selections obtained and protection of Plant Variety, to offer new varieties to market.

Keywords: varieties; seedlings; royalty; agronomic characterization.

Resumen

En datos de exportación, desde 2005 a día de hoy España es el primer país exportador de melocotón a nivel mundial ofreciendo una amplia gama de variedades y tipologías de fruto que cubren un largo periodo de recolección. La dependencia de variedades extranjeras, el acceso limitado a muchas de ellas, al excesivo pago de royalties y su falta de adaptación a las diferentes zonas de cultivo ha hecho que se desarrollen en España en los últimos 20 años más de 10 programas de mejora genética, privados, públicos y público-privados. El IMIDA está llevando a cabo un programa de mejora público-privado en colaboración con la empresa NOVAMED S.L., siendo los objetivos de mejora la diversificación respecto a: época de recolección y floración, productividad, requerimientos en reposo invernal, adaptación a las distintas condiciones de cultivo de la Región de Murcia, tipología de fruto y características organolépticas. El objetivo general de este estudio es la caracterización agronómica, morfológica y genética de las selecciones del programa de mejora público-privado IMIDA-NOVAMED, y la solicitud del Título de Obtención Vegetal, para ofrecer al sector productor nuevas variedades competitivas al mercado.

Palabras clave: variedades; híbridos; royalties; caracteres agronómicos.

* E-mail: alfonso.guevara@carm.es

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha producido una gran renovación varietal en el cultivo de melocotón, poniendo a disposición del productor un elevado número de variedades siendo difícil la correcta elección para cada zona de cultivo. Las nuevas variedades tienen su origen en más de 50 programas de mejora genética existentes en el mundo, liderados por Estados Unidos, de donde proceden el 51%. En Europa, Italia y Francia lideran la creación varietal procedente tanto de programas públicos como de numerosos programas desarrollados por obtentores privados, que en los últimos años han tenido un notable incremento. La innovación varietal ha procedido fundamentalmente de obtentores privados como F. Zaiger y N. & L. Bradford (California-USA), diferentes universidades (Davis, Texas, Florida y Michigan en Estados Unidos; DCA-Università di Bologna, Universidad de Pisa, Universidad de Florencia, en Italia), institutos públicos (INRA en Francia, CRA-Roma y Forlì en Italia) y obtentores públicos o privados como CIV, CAV, A. Minguzzi, V. Ossani en Italia; o A&L Maillard-ASF, Europépinières o R. Monteux Caillet-AC-Star Fruits en Francia, entre otros. Al igual que otros países productores, España se encontraba hasta hace pocos años bajo una fuerte dependencia de variedades foráneas, principalmente de Estados Unidos, Italia y Francia, al haber carecido de programas de mejora propios. Debido a la fuerte dependencia varietal, al acceso limitado a muchas nuevas variedades y a las condiciones económicas impuestas por los obtentores/editores/multiplicadores (pago de royalties), en las dos últimas décadas se han iniciado en España más de 10 programas de mejora, principalmente privados (Provedo, Frutaria-ALM, PSB Producción Vegetal), públicos (CITA, IVIA) o con la participación privada y pública (IMIDA-NOVAMED, ASF-IRTA-Fruit Futur, etc.) [2].

En España, los programas de mejora genética privados básicamente buscan la obtención de variedades de características mejores o similares a los mejores cultivares extranjeros para evitar la dependencia de programas foráneos [3]. En cambio, los programas de mejora genética públicos se plantean objetivos a corto plazo y largo plazo, buscando no sólo la independencia de programas extranjeros, sino que también la adaptación climática, la calidad interna y nutricional del fruto, la resistencia a plagas y enfermedades y la disminución de los costes de producción [3].

Dichos programas han permitido disponer ya en la actualidad de más de 130 variedades registradas y adaptadas tanto a las condiciones climáticas de las zonas de producción donde han sido seleccionadas, como a las exigencias de la distribución y del consumidor. Ello permitirá disminuir progresivamente la dependencia de variedades foráneas, no siempre adaptadas a nuestras zonas de cultivo, algunas no accesibles por el sector productor y otras sujetas en su mayoría al pago de royalties elevados que pueden llegar hasta los 6000 euros/ha. Los objetivos de los programas de mejora, ya sean foráneos o nacionales, han sido muy diversos y complementarios, intentando en general solucionar los problemas agronómicos de las diferentes áreas de producción. La mayor innovación se ha dado en la mejora de la presentación de los frutos, en especial en lo referido a la coloración, calibre, forma y aptitud a las manipulaciones. Las características cualitativas/gustativas han constituido otro objetivo importante, disponiendo en la actualidad desde variedades dulces, semidulces, equilibradas, ácidas y muy ácidas, siendo las dos primeras las de mayor aceptación por parte de los consumidores [2].

Los objetivos de la tesis son el estudio agronómico de las familias y preselecciones de híbridos del programa de mejora genética IMIDA-NOVAMED, la caracterización y estudios postrecolección de las preselecciones, la transferencia a productores y agricultores de variedades adaptadas a las zonas de cultivo de la Región de Murcia y la solicitud del Título de Obtención Vegetal de las selecciones del programa de mejora genética IMIDA-NOVAMED.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los híbridos y preselecciones a estudio se encuentran ubicados en dos fincas, la de Novamed en la Hoya del Campo con una superficie de 8 hectáreas y 500 horas frío aproximadamente, la de Torreblanca en Dolores de Pacheco en el campo de Cartagena con una superficie de 1 hectárea de cultivo y 400 horas frío aproximadamente, los híbridos están en un marco de plantación de 4x1m, mientras que las preselecciones a 5x4m sobre patrón *GxN15*, ambas fincas cuentan con estación meteorológica, embalse y cabezal de riego con control de fertirrigación.

Para la correcta valoración de las preselecciones y de las selecciones avanzadas se estudiarán los caracteres que se recogen en la Community Plant Variety Office (CPVO) y en la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV). Se tomarán datos del árbol, ramos mixtos, flores, hojas, frutos y hueso, siguiendo la tabla de características que se recopilan en los dos organismos (UPOV y CPVO).

2.1 Caracterización.

Del árbol se evaluará visualmente el tamaño, vigor y porte, controlando cada uno de los caracteres recopilados en las tablas de la UPOV.

Para la evaluación de los ramos mixtos se seleccionarán ramos del año con una longitud desde 20-30 cm hasta 80-100 cm, con yemas de flor, madera y terminando en una yema de madera. La densidad de yemas de flor se medirá a lo largo de 25 cm a 2/3 del ramo mixto, la distribución de las yemas de flor se evaluará teniendo en cuenta si se encuentran aisladas o en grupos de dos o más yemas.

Para estudiar los distintos caracteres de la flor se seleccionarán 25 flores de cada una de las variedades. Se valorará el tipo, la coloración interior del cáliz en la parte interior de los sépalos así como el color predominante en la corola. Otros caracteres a estudiar en la flor serán la forma, tamaño y número de pétalos, la posición de los estambres y estigma, presencia de polen y vellosidad o pubescencia en el ovario.

Los parámetros estudiados para caracterizar la fruta se realizarán sobre una muestra de 25 frutos representativos de cada una de las variedades. Para evaluar el tamaño, el peso, la caracterización de la forma del fruto, la forma del extremo pistilar. También se evaluará la simetría del fruto desde el extremo del pistilo. Otros caracteres a evaluar serán la simetría del fruto, la prominencia del borde de sutura, profundidad y ancho de la cavidad peduncular, para la caracterización de la epidermis de la fruta se seleccionará la misma muestra usada anteriormente de 25 frutos, determinando el color de fondo, sobrecoloración del fruto, el tono de la sobrecoloración, el patrón de esta y el grado o extensión. Para caracterizar la pulpa de las variedades estudiadas, se determinará la firmeza de la carne, respecto a la coloración de esta, se controlará el color de fondo, la coloración antociana bajo la piel, de la pulpa y alrededor del hueso, completando el estudio con la textura de la pulpa. Para realizar la determinación del contenido en sólidos solubles (°Brix) y acidez se preparará una muestra de zumo de los 25 frutos. La medida de °Brix se realizará con el refractómetro, realizando tres repeticiones de cada una de las muestras. La acidez se determinará con el valorador a partir de una muestra de 10 ml de zumo valorado con NaOH 0,1 N.

El tamaño del hueso respecto de la fruta se analizará midiendo su diámetro ecuatorial y longitudinal y comparándolo respecto al fruto, la forma en vista lateral, la intensidad de la coloración marrón, el relieve de la superficie, la tendencia al rajado y la adherencia de la carne al hueso y el grado de esta. Para la determinación de la muestra se seccionará el fruto por el borde de sutura, sometándose ambas mitades a un movimiento de torsión.

Se controlará la brotación de las yemas vegetativas realizando el control de la floración. Se definirá el comienzo de la floración como aquel estado vegetativo en que los árboles presentan un

5% de flores completamente abiertas, plena floración al 50% y final de floración al 90% con caída de pétalos.

Como control de la recolección se anotaran las fechas de maduración y si existe tendencia del fruto a caer antes de la recolección.

2.2 Estudio de necesidades de frío y calor

Para cuantificar la adaptación de las variedades a una determinada zona de cultivo se calcularan las necesidades de frío de cada variedad.

Siguiendo la metodología descrita por el equipo de mejora genética de prunus del CEBAS-CSIC [5], se determinará la fecha en la que las variedades habrán cubierto las necesidades de frío. Para la cuantificación de las necesidades de frío se usaran los siguientes modelos: las horas bajo 7 °C (HF) [6], las unidades de frío (UF) según el modelo de Utah [4] y el modelo dinámico o de porciones [1]. Las temperaturas horarias se controlaron con la estación meteorológica ubicada en la finca del Servicio de Información Agraria de Murcia (SIAM).

3. AGRADECIMIENTOS

Fondos Feder 2014-2020: “Una manera diferente de hacer Europa”.

4. REFERENCIAS

- [1] Fishman S, Erez A, Couvillon GA. (1987). The temperature-dependence of dormancy breaking in plants - computer-simulation of processes studied under controlled temperatures. *J. Theoret. Biol.* 126 (3), 309-321.
- [2] Iglesias, I. and Casals, E. (2015). Producción e innovación varietal en el cultivo del melocotón en España. *Vida rural*, ISSN 1133-8938,391, 20-27.
- [3] Llácer, G., Alonso, J.M., Rubio, M.J., Batlle, I., Iglesias, I., Vargas, F.J., García-Brunton, J., and Badenes, M.L. (2009). Situación del material vegetal de melocotonero utilizado en España. *ITEA* 195 (1), 67-83.
- [4] Richardson EA, Seeley SD, Walker DR. (1974). A model for estimating the completion of rest for “Redhaven” and “Elberta” peach trees. *HortSci.* p. 331-332.
- [5] Ruiz D, Campoy JA, Egea J. (2007). Chilling and heat requirements of apricot cultivars for flowering. *Environ. Exp. Botany* 61(3), 254-263.
- [6] Weinberger JH. (1950). Chilling requirements of peach varieties. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 56(DEC), 122-128.

Genotyping, phenotyping and transcriptomic analysis of accessions of *Vicia faba*, *Pisum sativum* and *Vigna unguiculata*

Genotipado, fenotipado y análisis transcriptómico de accesiones de *Vicia faba*, *Pisum sativum* y *Vigna unguiculata*

M. Martos-Fuentes^{*1,2}, J. Weiss^{2,3}, C. Egea-Gilabert^{2,3}, M. Egea-Cortines^{2,3}, J.A. Fernández^{1,2}

¹ Departamento de Producción Vegetal, Paseo Alfonso XIII, 48, E.T.S. Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, 30203, Cartagena, España.

² Instituto de Biotecnología Vegetal. Edificio I+D+i, Plaza del Hospital s/n. Campus Muralla del Mar, Universidad Politécnica de Cartagena, 30202, Cartagena, España.

³ Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria, Paseo Alfonso XIII, 48, E.T.S. Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, 30203, Cartagena, España.

Abstract

Legumes are the second largest world crop production after cereals, demonstrating their importance for human and animal consumption. Faba bean (*Vicia faba*), pea (*Pisum sativum*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) are legume species with agricultural interest in the European Union. The selection of varieties of these species through genotyping, phenotyping and transcriptomics, allows identifying varieties with nutritional quality (high protein content) and good agronomic qualities (resistance to abiotic and biotic stress) optimal for a sustainable and competitive production of protein crops in Europe.

Keywords: Legumes; SNPs; morphology; genetic expression; protein content.

Resumen

Las leguminosas son el segundo cultivo con mayor producción mundial después de los cereales, por lo que su importancia para consumo animal y humano es crucial. El haba (*Vicia faba*), el guisante (*Pisum sativum*) y el caupí (*Vigna unguiculata*) son especies de leguminosas con interés agronómico en la Unión Europea. La selección de variedades de estas especies, mediante técnicas de genotipado, fenotipado y transcriptómica, permitirá la obtención de variedades con calidad nutricional (alto contenido en proteína) y buenas cualidades agronómicas (resistencia a estrés abiótico y biótico) óptimas para una producción sostenible y competitiva de proteínas en Europa.

Palabras clave: Leguminosas; SNPs; morfología; expresión genética; contenido proteico.

1. INTRODUCCIÓN

Las leguminosas desempeñan un papel importante en la dieta humana y en la animal ya que un tercio de las proteínas consumidas en la dieta humana proceden de ellas [1]. Se sabe que las legumbres contienen un alto contenido en proteínas y una proporción adecuada de carbohidratos y grasas, entre otros compuestos, lo cual las hacen idóneas para una alimentación equilibrada. El valor nutricional de los alimentos depende del genotipo y de las condiciones de crecimiento, por

* E-mail: marina.fuentes@upct.es

lo que estudios enfocados al conocimiento de las interacciones entre estos dos factores son importantes [2].

La leguminosa con mayor producción y más extendida en el mundo es la soja (*Glycine max*). Con 308 Mt/año en 2014 es uno de los principales productos importados para consumo humano y animal en la Comunidad Europea [3], lo que supone una importante dependencia de esta especie vegetal. La sustitución de alimentos a base de soja por otros cultivados “localmente” con alto valor nutricional es un aspecto importante para la seguridad alimentaria en Europa.

Es sabido que las leguminosas son beneficiosas para el medio ambiente, principalmente por las ventajas derivadas de su simbiosis con los rizobios fijadores de nitrógeno ya que, entre otros factores, esto contribuye a la disminución de la contaminación por nitratos. El empleo de variedades adaptadas a los distintos climas, así como la rotación de cultivos y otras técnicas agronómicas, pueden proporcionar una fuente competitiva y sostenible de proteínas en Europa [4].

La clave para el éxito de cualquier programa de mejora es la disponibilidad de una amplia variabilidad genética de las características de interés. Por lo que la evaluación de la diversidad genética entre poblaciones distantes geográficamente, es un aspecto importante para el desarrollo de líneas de mejora eficientes [5]. Para un aprovechamiento óptimo de los recursos disponibles hoy en día y un mayor conocimiento de la respuesta de los organismos al ambiente es necesario el empleo conjunto de técnicas genómicas y transcriptómicas.

Actualmente, debido a los grandes avances en la metodología de secuenciación y anotación de genomas de leguminosas, junto a los avances técnicos y bioinformáticos, es posible la identificación de genes involucrados en aspectos importantes mediante la sintenia [6]. Hasta el momento los genomas de leguminosas secuenciados son los de soja (*Glycine max*), gandul (*Cajanus cajan*), garbanzo (*Cicer arietinum*), lotus (*Lotus japonicus*), lupino (*Lupinus angustifolius*), alfalfa (*Medicago truncatula*) y judía o fríjol (*Phaseolus vulgaris*) [7]. Por otro lado, está muy avanzada la secuenciación de guisante (*Pisum sativum*), caupí (*Vigna unguiculata*) y cacahuete (*Arachis hypogaea*).

Debido a la mencionada dependencia de la soja por parte de la Unión Europea y dentro del 7º programa marco, se ha aprobado un proyecto llamado “Enhancing of legumes growing in Europe through sustainable cropping for protein supply for food and feed” (EUROLEGUME). El objetivo último de este proyecto europeo es un uso sostenible de las leguminosas y el suelo, para asegurar fuentes de proteínas de alta calidad en la dieta de los ciudadanos europeos, aumentando la competitividad del cultivo de las legumbres para alimentación humana y animal. El presente proyecto de tesis está enmarcado dentro de este proyecto europeo y tiene como objetivos seleccionar y fenotipar accesiones de haba (*Vicia faba*), guisante (*Pisum sativum*) y caupí (*Vigna unguiculata*) adaptadas al clima mediterráneo, genotipar las accesiones mediterráneas en comparación con accesiones adaptadas a zonas frías e identificar la expresión de genes relacionados con el estrés abiótico y la calidad y cantidad proteica. Además, a través del análisis transcriptómico, obtener un conocimiento profundo sobre la expresión y regulación génica de características como adaptación a estrés abiótico y desarrollo y composición de semillas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo a desarrollar estará compuesto de una serie de trabajos en campo seguidos por trabajos en el laboratorio (Fig. 1).

2.1 Selección de accesiones adaptadas al clima mediterráneo

Mediante el uso de descriptores del “International Board for Plant Genetic Resources” (IBPGR) [8], se caracterizará morfológicamente y se evaluará en campo el comportamiento de

accesiones locales de caupí (Tabla 1), haba y guisante. Los descriptores a tener en cuenta serán el tiempo desde la siembra hasta la floración y la maduración de vainas, la duración de la floración, el tipo de crecimiento (trepador, rastrero, etc.) el peso de las semillas, la incidencia de enfermedades y plagas, la altura de las plantas, la altura hasta la primera vaina, el color de la flor y el número de vainas y semillas por planta.

2.2 Genotipado de diferentes accesiones europeas

Se realizará el genotipado de las distintas especies mediante marcadores moleculares (SNPs). La determinación de las secuencias de los SNPs de caupí se llevará a cabo en EEUU y la del guisante y el haba se hará mediante Next Generation Sequencing (IonTorrent™) en el laboratorio de la Unidad de Genética Molecular del Instituto de Biología Vegetal de la UPCT.

2.2 Análisis bioquímico y de desarrollo de semillas

Se medirá el contenido proteico y el desarrollo de las semillas (flores y vainas) de las accesiones seleccionadas por su comportamiento macroscópico, así como en el genotipado.

2.2 Identificación de genes relacionados con el estrés abiótico y la calidad y contenido proteico

Se realizarán una serie de ensayos en campo con las accesiones seleccionadas con alto contenido proteico. Para ello, se someterá a las plantas a estrés hídrico y se hará un análisis transcriptómico de distintos tejidos (vainas, semillas y hojas).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados esperados de este proyecto de tesis incluyen la identificación de genotipos de caupí, haba y guisante con alto contenido en proteína, buena adaptación agronómica y altas producciones. Este conocimiento facilitará el desarrollo de líneas mejoradas (a partir de las accesiones locales, adaptadas al clima mediterráneo), con buenas aptitudes en campo que sean una fuente sostenible y competitiva de proteína para consumo humano y animal. El genotipado mediante el análisis de SNPs permitirá identificar las relaciones entre las accesiones al nivel genético. El análisis transcriptómico contribuirá a la selección de líneas mejoradas para el estrés abiótico.

4. AGRADECIMIENTOS

Al proyecto EUROLEGUME (EU FP7 Research Project No. 613781) por financiar este proyecto de tesis doctoral.

5. REFERENCIAS

- [1] Graham, P.H. and Vance, C. P. (2003). "Update on Legume Utilization Legumes: Importance and Constraints to Greater Use," vol. 131, no. March, pp. 872-877.
- [2] Levy, D. (1986). Genotypic variation in the response of potatoes (*Solanum tuberosum* L.) to high ambient temperatures and water deficit. F. Crop. Res. 15(1), 85-96.
- [3] FAOSTAT [Online]. Available: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E> [Accessed: 8-Apr-2016].
- [4] Nemecek, T., von Richthofen, J. S., Dubois, G., Casta, P., Charles, R., and Pahl. H. (2008). Environmental impacts of introducing grain legumes into European crop rotations. Eur. J. Agron. 28(3), 380-393.
- [5] Eathington, S. R., Crosbie, T. M., Edwards, M. D., Reiter, R. S., and Bull. J. K. (2007). Molecular Markers in a Commercial Breeding Program. Crop Sci. 47(Supplement_3), S-154.

[6] Gepts, P., Beavis, W. D., Brummer, E. C., Shoemaker, R. C., Stalker, H. T., Weeden, N. F., and Young, N. D. (2005). Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. *Plant Physiol.* 137, 1228–1235.

[7] Legume Information System. [Online]. Available: <http://legumeinfo.org/home> [Accessed: 8-Apr-2016].

[8] IBPGR (1982). Descriptors for cowpea. International Board for Plant Genetic Resources, Rome.



Figura 1. A: Detalle de una vaina de caupí. B: Cultivo de caupí al aire libre. C: Secuenciador.

Tabla 1. Acciones de caupí para su caracterización. CRF-INIA: Centro de Recursos Fitogenéticos del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. RMS: Red Murciana de Semillas.

Nombre	Institución de origen
BGE022146	CRF-INIA
BGE038474	CRF-INIA
BGE038477	CRF-INIA
BGE038478	CRF-INIA
BGE038479	CRF-INIA
BGE039238	CRF-INIA
BGE040000	CRF-INIA
BGE040818	CRF-INIA
BGE040819	CRF-INIA
BGE044375	CRF-INIA
Vi2	RMS
Vi 3	RMS
Vi4	RMS
Vi 10	RMS
Vi12	RMS
Vi13	RMS

Development of software tools to control an artificial vision-based phenotyping system

Desarrollo de una herramienta software para el control de un sistema de fenotipado basado en visión artificial

F. Pérez Sanz*^{1,2}, J. Weiss¹, M. Egea-Cortines¹, P.J. Navarro²

¹IBV, Genética Molecular. Edif. I+D+i, Campus Muralla del Mar, Universidad Politécnica de Cartagena, 30202, Cartagena, Murcia. Spain.

²DSIE, Campus Muralla del Mar, Universidad Politécnica de Cartagena, 30202, Cartagena, Murcia. Spain.

Abstract

Computer vision systems allow to automate the process of obtaining phenotypic features in plants. These systems produce large amounts of data in a quick fashion and with a low associated cost. In this work we present a flexible software tool for phenotyping analysis based on computer vision. The tool allows a total management of the experiment parameters such as experiment time, hours of nighttime and daytime periods or use of different cameras with time of image acquisition. The system has been programmed in C++ allowing it to be applied in different computer environments, using different computer vision algorithms to perform image processing.

Keywords: Circadian clock; phenomics; growth kinetics

Resumen

Los sistemas basados en visión artificial permiten automatizar el proceso de fenotipado de los sistemas biológicos. Estos sistemas permiten capturar grandes cantidades de datos de forma rápida y con un bajo coste asociado. Hemos desarrollado una herramienta software flexible para el fenotipado basada en visión artificial. La herramienta controla los parámetros del experimento: días de experimento, horas día/noche, permite la utilización de diferentes tipos de cámaras, etc. La herramienta ha sido programada en C++ lo que ha permitido integrar y ejecutar diferentes algoritmos de procesado de imagen de librerías como OPENCV y MIL.

Palabras clave: Cronobiología; fenómica; cinética crecimiento.

1. INTRODUCCIÓN

El principal objetivo de las técnicas de fenotipado basado en visión artificial, es la obtención de datos fisiológicos, de crecimiento y desarrollo u otras propiedades fenotípicas de la planta a través de un proceso automatizado. La visión artificial es un área de investigación muy

* E-mail: fernando.perez8@um.es

activa en el diagnóstico médico, la industria, o la teledetección entre otros [1], y muchas de sus técnicas de procesamiento y análisis de imágenes pueden ser aplicadas al fenotipado de plantas.

En los últimos años, se han desarrollado sistemas de fenotipado [2–4], cuyo factor limitante es el manejo de la cantidad de datos generados [5]. Hemos desarrollado un software con interfaz gráfica que nos permite diseñar y poner en funcionamiento diferentes tipos de experimentos, variando ciclos de iluminación, tiempos de captura o parámetros de la imagen, de manera que podemos realizar periodos variables de grabación sin necesidad de supervisión. Hemos programado una serie de scripts escritos en Visual C++ para automatizar parte del procesamiento y análisis de las imágenes obtenidas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El sistema de fenotipado basado en visión artificial desarrollado está constituido por una cámara industrial con dos CCDs (RGB e infrarrojo), sistema de iluminación de dos elementos (LED diurno y LED infrarrojo), PC-Industrial y tarjeta USB GPIO. Este equipo es controlado mediante el software desarrollado con interfaz gráfica de usuario (GUI). El software se ha desarrollado en C/C++. La interfaz gráfica está basada en la librería de C/C++ GTK.

Los parámetros de la cámara a los que se tiene acceso para su configuración y control son: ajuste de la ganancia (Gain Raw), ajuste de los canales RGB, velocidad de obturación y autobalance de blancos. Se puede seleccionar el sensor RGB o IR a utilizar en cada momento y los intervalos de disparo de la cámara. Permite programar día de comienzo y fin de la grabación, el horario de los ciclos de grabación día/noche, desde luz continua, noche continua, o intervalos de día/noche de diferente duración. Finalmente es posible obtener en formato CSV y formato JSON todos los parámetros del sistema. Esto permite realizar diferentes grabaciones en las mismas condiciones. La comunicación con la tarjeta GPIO ha sido implementada empleando la librería *termios* incluida en el núcleo de GNU/Linux. Esta librería permite, mediante protocolos de comunicación serie, el envío de órdenes a los diferentes canales de la tarjeta a través del puerto USB. Ésta, a su vez, actúa sobre una placa de relés cuya misión es activar o desactivar de forma individual los elementos del sistema de iluminación (Fig. 1).

Se han obtenido varios miles de imágenes RGB e IR que han sido analizadas de forma semiautomática empleando las librerías MIL (Matrox Imaging Library V9). De esta forma, se han escrito varios *script* para la importación, segmentación e identificación de los elementos de interés dentro de la imagen y la extracción de la información (centro de gravedad, longitud, área, ángulo respecto a la horizontal) de los órganos de estudio seleccionados en la planta, para su posterior análisis estadístico (Fig. 2). El sistema se ha probado con *Antirrhinum sp.* y *Petunia sp.* así como diferentes líneas genéticas (*Petunia x hybrida PhRNAiZTL*, *Antirrhinum majus L. subsp. majus* LHY RNAi, WT).

3. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Los sistemas de fenotipado basados en visión artificial, pueden ser muy efectivos para la búsqueda de patrones de comportamiento cíclico en plantas. Sin embargo para que sean realmente efectivos, es necesario disponer de un software que permita controlar los parámetros de interés del sistema así como la configuración de forma flexible e intuitiva de dicho sistema.

El software que hemos desarrollado, permite controlar el sistema. Al estar desarrollado en C/C++ facilita la integración de hardware propietario. Además es fácilmente extensible pudiendo incluir nuevas funcionalidades como el control de temperatura o el envío/recepción de información desde equipos informáticos externos. Finalmente, el desarrollo de *scripts* de Visual C++ con las funciones de procesamiento de imágenes de la MIL nos han permitido automatizar el

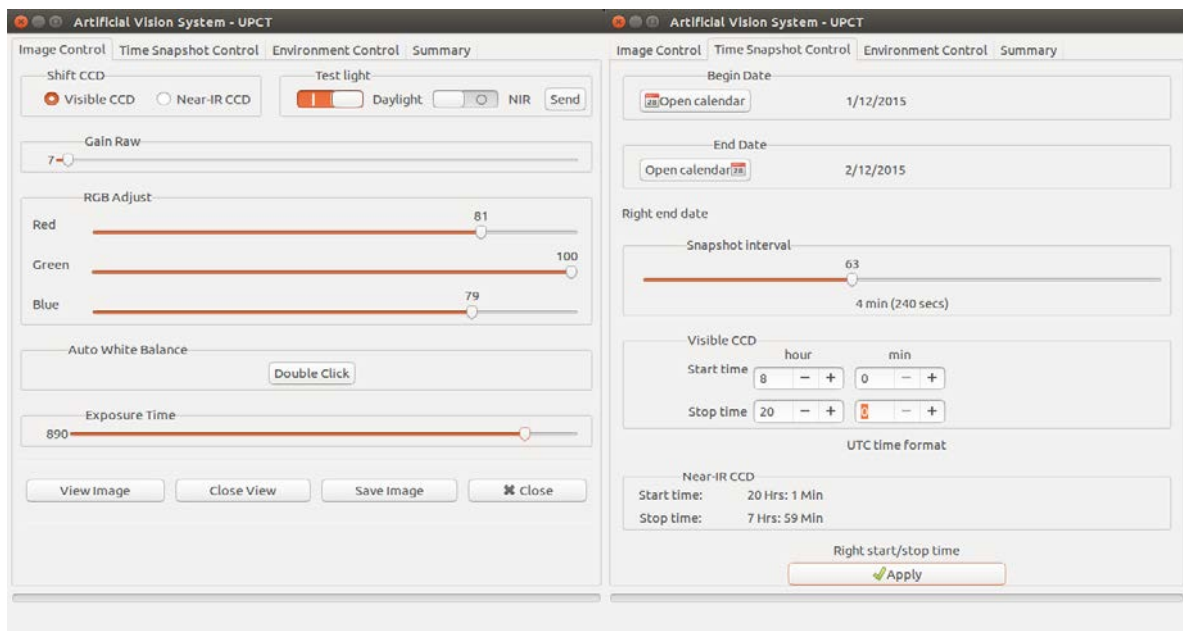
análisis de miles de imágenes, que de otra forma habría resultado un proceso con un coste de tiempo muy elevado.

4. AGRADECIMIENTOS

El trabajo realizado se enmarca dentro de los proyectos MICINN BFU-2013-45148-R y ViSel-TR(TIN2012-39279) y ha sido presentado en el II Simposio Nacional de Ingeniería Hortícola, celebrado en Almería del 10-12 de febrero de 2016.

5. REFERENCIAS

- [1] Fahlgren, N., Gehan, M., Baxter, I. (2015). Lights, camera, action: high-throughput plant phenotyping is ready for a close-up. *Curr. Opin. Plant Biol.* 24, 93–99.
- [2] Aboeela, A., Liptay, A., Barron, J. L. (2005). Plant Growth Measurement Techniques using Near-Infrared Imagery. *Int. J. Robot. Autom.* 20(1). DOI: 10.2316/Journal.206.2005.1.206-2775.
- [3] Navarro, P. J., Fernández, C., Weiss, J., Egea-Cortines, M. (2012). Development of a configurable growth chamber with a computer vision system to study circadian rhythm in plants. *Sensors* 12(11), 15356–15375.
- [4] Nguyen, T., Slaughter, T., Max, N., Maloof, J., Sinha, N. (2015). Structured Light-Based 3D Reconstruction System for Plants. *Sensors* 15(8), 18587–18612.
- [5] Tindall, A. J., Waller, J., Greenwood, M., Gould, P. D., Hartwell, J., Hall, A. (2015). A comparison of high-throughput techniques for assaying circadian rhythms in plants. *Plant Methods* 11(1). DOI: 10.1186/s13007-015-0071-9.



(a) (b)
Figura 1. (a,b) Interfaz desarrollada.

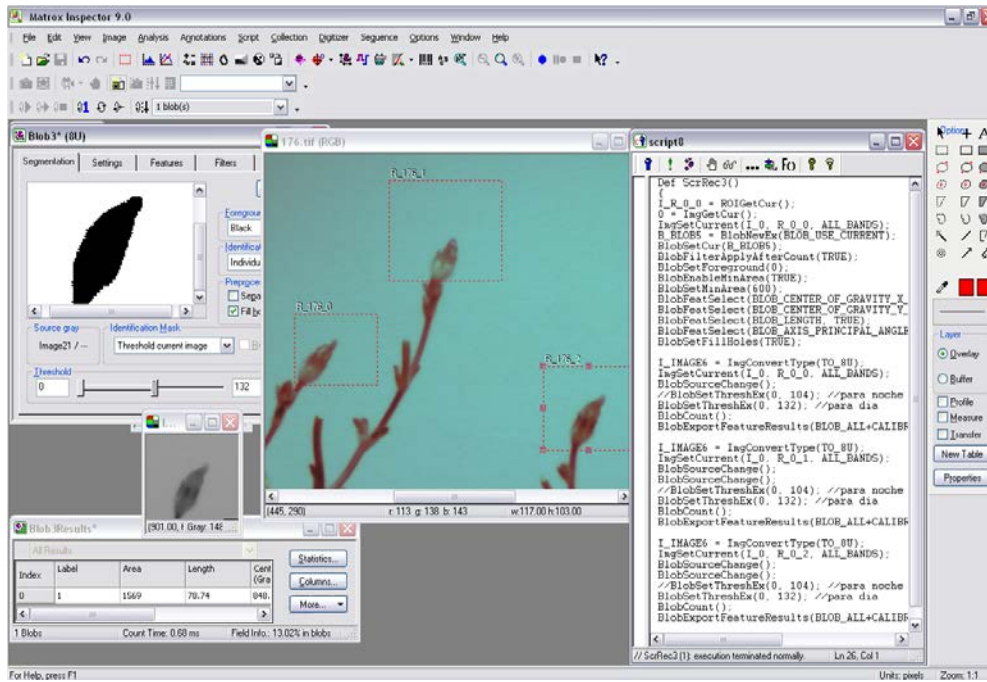


Figura 2. Software *Matrox* con *script* en ejecución



POSTER SESSION III

Plant Production
Technology and
Engineering

Deficit irrigation automation assessment in cherry tree. Improve of irrigation management to ensuring productivity and sustainability.

Evaluación de la automatización del riego deficitario en cerezo. Mejora de la gestión del agua para asegurar la productividad y sostenibilidad.

V. Blanco*, R. Domingo, A. Pérez Pastor

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

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 recently started research work is performed in sweet cherry, var. "Prime Giant", whose fruit development and commercial maturity are reached before the period of maximum evaporative demand. In order to assess the suitability of "Prime Giant" in semiarid climate to be managed under regulated deficit irrigation (RDI), water relations and agronomic response to RDI were studied.

Keywords: "Prime Giant"; regulated deficit irrigation; ICTs; 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. El trabajo de investigación recientemente iniciado se desarrolla en cerezo, variedad "Prime Giant", en ella tanto el desarrollo del fruto como su madurez comercial se alcanzan antes del periodo de máxima demanda evaporativa. Con el objetivo de valorar la idoneidad de "Prime Giant" para ser manejada en riego deficitario controlado (RDC) en clima semiárido iniciamos un estudio sobre las relaciones hídricas y respuesta agronómica del cerezo al RDC.

Palabras clave: relaciones hídricas; "Prime Giant"; riego deficitario controlado; TICs.

1. INTRODUCCIÓN

El desequilibrio actual entre una oferta de recursos hídricos decreciente y una demanda hídrica creciente desafía el poder mantener una agricultura de regadío competitiva en zonas áridas y semiáridas. La agricultura de regadío es el principal consumidor de agua a nivel mundial. Por ello, se necesita emprender acciones dirigidas al aumento de la productividad y al ahorro de agua. La mayor eficiencia alcanzada en el transporte, distribución y aplicación del agua a nivel de

* E-mail: victorblanco1990@hotmail.com

parcela sigue siendo insuficiente para poder satisfacer las necesidades hídricas de los cultivos. La mejora de la eficiencia de uso del agua puede venir a partir de una programación del riego más científica y técnica. En este sentido, el empleo de estrategias RDC pueden contribuir al necesario ahorro de agua manteniendo e incluso mejorando la producción y calidad de las cosechas.

El RDC se basa en reducir los aportes hídricos en aquellos períodos fenológicos considerados no críticos para la producción y calidad de la cosecha y satisfacer completamente la demanda del cultivo durante los periodos fenológicos en los que una privación pudiera afectar a uno o ambos factores. Distintos estudios realizados en frutales y vid demuestran que algunas especies son capaces de tolerar déficits hídricos en determinados períodos del ciclo de cultivo sin mermas de producción ni de calidad, como es el caso del limonero [1], almendro [2], nectarina [3], etc.

Para el trabajo de investigación se ha elegido el cerezo [*Prunus avium* (L.)] al considerarlo un cultivo prometedor por sus elevados precios de mercado, por ser una alternativa interesante a otros cultivos y además por permitir simultanear su manejo con el de otros frutales de la explotación.

En el cerezo, el desarrollo de fruto y semilla es de muy corta duración en comparación con el crecimiento vegetativo. El ciclo de desarrollo del fruto en cerezo se asemeja a una curva doble sigmoidea en la que se identifican tres etapas (I, II y III). La etapa I, fase de división celular, desde plena floración hasta el inicio del endurecimiento del hueso, la etapa II, de duración casi imperceptible, con el endurecimiento de hueso y desarrollo del embrión y la etapa III con la elongación celular del fruto, desde el fin del endurecimiento del hueso hasta su maduración total. El cerezo presenta una evolución de sus requerimientos hídricos a lo largo de la temporada de crecimiento. Parte de los cambios se explican por la variación que presenta la demanda evapotranspirativa de la atmósfera, pero otra parte se debe a cambios en el cultivo. Ambos factores determinan que a lo largo del ciclo productivo las necesidades hídricas del cultivo aumenten constantemente durante la primera fase de desarrollo del cultivo, jugando un papel importante el componente de crecimiento y desarrollo vegetativo. Periodos críticos en los que el agua no puede faltar son el de división celular y el de crecimiento rápido del fruto, I y III.

Los requerimientos hídricos del cultivo para un momento dado se calcularán a partir de la fórmula propuesta por la FAO [4]:

$$ET_c = ET_0 \times K_c \times K_r$$

donde, ET_0 es la evapotranspiración de referencia, K_c el coeficiente de cultivo[5] y K_r un coeficiente corrector por localización dependiente de la superficie de suelo cubierta por las copas de los árboles [6].

La reducción del suministro hídrico en poscosecha, periodo que incluye la etapa de diferenciación floral, no afecta a la producción de la siguiente cosecha; sin embargo, puede originar un alto porcentaje de frutos dobles [7]. Así, el uso incontrolado del RD en poscosecha, generalmente por estrés severo, puede producir efectos indeseados sobre la producción y calidad del año siguiente (menor cuajado y producción, y en ciertos casos reducciones de firmeza o deformaciones del fruto). Sin embargo, el riego deficitario controlado que no supera el umbral de -1,5 MPa de potencial de tallo al mediodía en poscosecha puede permitir ahorros de agua muy importantes sin afectar o afectando mínimamente a la producción y calidad de la cereza [8].

Por ello, la parte experimental del trabajo de tesis consistirá en la caracterización y evaluación de la influencia de la estrategia de riego sobre las relaciones hídricas, producción y calidad de la cereza.

El objetivo global es mejorar la gestión del riego del cerezo en un escenario de limitada disponibilidad de agua, a través de la caracterización y evaluación de la influencia de distintos

regímenes de riego sobre las relaciones hídricas, producción y calidad de la cereza. La finalidad práctica del estudio es establecer las bases y criterios que permitan una programación automatizada del riego basada en medidas en suelo y planta.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

El ensayo se realizará en una parcela de 0,5 ha perteneciente a la finca comercial "Finca Toli" en Jumilla, Murcia (38° 8' N; 1° 22' W y 680 m de altitud). El suelo es de textura franco-arenosa y medianamente pedregoso, lo que le confiere unas propiedades de retención de agua medias. La plantación, constituida por cerezos "Prime Giant" sobre SL 64 como variedad base y "Brooks" y "Early Lory" como polinizadores, de 15 años de edad y dispuesta a marco de plantación de 5 m x 3 m, está formada en vaso bajo con un área sombreada de aproximadamente el 55% y diámetro de tronco de 16,3 cm.

El diseño del sistema de riego por goteo será de un único lateral por hilera de árboles con 3 goteros de 4 L h⁻¹ por árbol. El agua es de buena calidad, conductividad eléctrica de 0,8 dS m⁻¹ y contenido en sodio y cloruros de 79,1 y 120,5 mg L⁻¹, respectivamente.

Consta de 5 tratamientos de riego según un diseño de bloques al azar con 4 repeticiones y 7 árboles por repetición. Dos de las repeticiones estarán equipadas con una instrumentación con plataforma cableada utilizando un datalogger y dos multiplexores con un total de 10 puntos de medida y otras dos repeticiones utilizando una red de sensores inalámbrica (WSN) con un nodo de comunicación por punto de medida, utilizando protocolo ZigBee y con una configuración topológica en estrella. El acceso a los datos se realizará a través de un radio-enlace WIFI con un proveedor local de internet. En cada punto de medida se registrarán las variables: i) Estado energético del suelo: Sensores de potencial matricial MPS6 a 25 y 50 cm., ii) Contenido volumétrico de agua en el suelo: Sensores de humedad Enviroscan a 20, 40 y 70 cm., iii) Máxima contracción diaria: Dendrómetros, LVDT, radial, y D5 UMS, perimetral.

Además, se controlará el estado hídrico de la planta, a partir de medidas de potencial hídrico de tallo a mediodía (Ψ_t) y de fruto (Ψ_f) con cámara de presión Scholander [9]. De igual manera, se determinará el intercambio gaseoso en hoja con CIRAS-II (PP Systems, Hitchin, UK; LCA4 ADC-Biosciences, Hoddesdon, UK), obteniendo la evaporación, la conductancia estomática y la fotosíntesis neta del cultivo, ambas mediciones en 6 árboles por tratamiento.

Los tratamientos de riego que se impondrán son: i) control, CTL, satisface las necesidades hídricas máximas del cultivo (110% ET_{cg}) durante toda la campaña, ii) agricultor, AGR, con su experiencia, iii) riego deficitario sostenido, RD₈₅, programado al 85% de la ET_{cg} durante toda la estación de riegos, iv) riego deficitario controlado, RDC₉₀₋₆₅, programado al 90% de la ET_{cg} durante precosecha y al 65% en poscosecha, v) riego deficitario controlado, RDC₁₀₀₋₅₅, programado al 100% de la ET_{cg} durante precosecha y al 55% en poscosecha. Durante los días de cosecha, para no penalizar el tamaño de los frutos, los tratamientos deficitarios se regarán como el control.

3. RESULTADOS ESPERABLES

A partir del estudio de la respuesta agronómica del cultivo a los diferentes tratamientos de riego estaremos en condiciones de poder recomendar la estrategia de riego más adecuada bajo las condiciones de estudio. Este trabajo de tesis pretende, igualmente, poder establecer relaciones entre los indicadores del estado hídrico de la planta y las variables climáticas fácilmente disponibles que nos permitan establecer líneas de referencia para la programación del riego a partir de medidas continuas y en tiempo real. Es también esperable, que la tesis aporte información útil sobre el papel jugado por las plataformas de control y supervisión en la

programación científica y técnica del RDC en cerezo, es decir, su posible contribución al RDC de precisión en cerezo. Todo ello, nos permitirá disponer de un conocimiento más preciso del funcionamiento hídrico del cerezo y por lo tanto de la manera en la que deba ser manejado el riego para una mayor productividad del agua y rentabilidad del cultivo.

4. CONCLUSIONES

Para solucionar o al menos mitigar los severos déficits hídricos estacionales y la escasa disponibilidad de agua en las zonas semiáridas es necesario realizar una adecuada gestión del agua a través de una eficiente programación y automatización del riego. Teniendo en cuenta que el desarrollo del fruto y madurez comercial se alcanzan antes del periodo de máxima demanda climática, el riego deficitario controlado poscosecha puede resultar muy ventajoso. Sin embargo, es necesario validar a través de ensayos de campo la idoneidad de "Prime Giant" para ser manejado bajo riego deficitario controlado.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de Tesis Doctoral será financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad a través del proyecto RIDEFRUIT. Referencia: AGL2013-49047-C2-1R.

6. REFERENCIAS

- [1] Domingo, R., Ruiz-Sánchez, M.C., Sánchez-Blanco, M.J., Torrecillas, A. (1996). Water relations, growth and yield of Fino lemon trees under regulated deficit irrigation. *Irrigation Sci* 16, 115-123.
- [2] Egea, G., Nortes, P.A., Domingo, R., Baille, A., Pérez-Pastor, A. (2013). Almond agronomic response to long-term deficit irrigation applied since orchard establishment. *Irrigation Sci* 31, 445-454.
- [3] De la Rosa, J.M., Domingo, R., Gómez-Montiel, J., Pérez-Pastor, A. (2015). Implementing deficit irrigation scheduling through plant water stress indicators in early nectarine trees. *Agric Water Manag* 152, 207-216.
- [4] Allen, R.G., Pereira, L.S., Raes, D., Smith, M. (1998). Crop evapotranspiration guidelines for computing crop water requirements. *FAO Irrigation and drainage paper* 56.
- [5] Marsal, J. (2012). Sweet Cherry. Crop yield response to water. *Fruit trees and vines. FAO Irrigation and drainage paper* 66, 450-457.
- [6] Fereres, E. y Castel, J.R. (1981). Drip irrigation management. Division of Agricultural Sciences, University of California. *Publicación Leaflet* 21259.
- [7] Ferreyra, R. Riego en cerezo, requerimientos hídricos, sistemas de riego y control de heladas. 1^o Simposio Internacional del cultivo del cerezo en la Patagonia Occidental, 143-167.
- [8] Marsal, J., López, G., Arbones, A., Mata, M., Vallverdu, X., Girona, J. (2009) Influence of post-harvest deficit irrigation and pre-harvest fruit thinning on sweet cherry (cv. New Star) fruit firmness and quality. *J Hortic Sci Biotech* 84:3, 273-278.
- [9] Scholander, P., Bradstreet, E., Hemmingsen, E., Hammel, H. (1965). "Sap Pressure in Vascular Plants: Negative hydrostatic pressure can be measured in plants". *Science* 148 (3668), 339-346.

The combined use of tree species and biochar amendments for the phytomanagement of mine tailings under semiarid climate

Uso combinado de especies arbóreas y biochar para el fitomanejo de residuos mineros en clima semiárido

D. Martínez-Oró*, I. Párraga-Aguado, H.M. Conesa

Departamento 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.

Abstract

The present PhD Thesis proposal aims to provide technical-scientific solutions for the reclamation of mine tailings in the semiarid area of the Sierra de Cartagena-La Unión, as a strategy for achieving a sustainable environmental restoration. The reduction of risks associated to metal(loid)s will be also considered. In order to achieve this aim, the effects of biochar addition (alone and in combination with other organic amendment) on the biogeochemical behavior and ecotoxicity of the mine tailings will be studied. In addition, the role of *Pinus halepensis* and *Tetraclinis articulata* as key species for the restoration of mine tailings will be discussed. Ecology surveys on the spontaneous communities associated to these two species on mine tailings will be performed. Finally, ecotoxicological bioassays employing seeds, seedlings and edaphic invertebrates will be tested.

Keywords: phytostabilisation; heavy metals; ecotoxicology; organic amendment.

Resumen

La presente propuesta de tesis doctoral busca aportar soluciones científico-técnicas para la revegetación de residuos procedentes de las labores de concentración de mineral (balsas mineras) en el contexto semiárido de la Sierra de Cartagena-La Unión, como una estrategia de restauración ambiental sostenible a medio y largo plazo que incluya la reducción de los riesgos de ecotoxicidad asociados a la presencia de metales y metaloides. Para ello se estudiará el efecto del biochar (sólo y en combinación con otra enmienda orgánica) sobre el comportamiento biogeoquímico y la toxicidad de residuos mineros y si dicho efecto puede favorecer el papel de *Pinus halepensis* y *Tetraclinis articulata* como especies clave para la restauración de balsas mineras. Además, se realizarán muestreos de ecología de las comunidades vegetales asociadas a éstas dos especies que crecen espontáneamente en balsas mineras. Por último, se practicarán bioensayos de ecotoxicidad con semillas, plántulas e invertebrados edáficos.

Palabras clave: fitoestabilización; metales pesados; ecotoxicología; enmienda orgánica.

* E-mail: duli.martinez@upct.es

1. INTRODUCCIÓN

Las balsas de lodos son el resultado de la acumulación sobre el terreno de los residuos producidos durante el proceso de lavado y concentración de minerales. Tras el abandono de la actividad minera en la Sierra de Cartagena-La Unión la mayoría de las balsas quedaron desnudas y expuestas a la acción de los agentes erosivos, originando una serie de impactos sobre el entorno y aumentando el riesgo de transferencia de contaminantes a la biota [1,2]. El empleo de la fitorremediación, en términos de fitomanejo [3, 4] o restauración paisajística, se considera la alternativa más adecuada para estabilizar los residuos mineros. De esta manera, la cubierta vegetal protege al suelo de la erosión eólica e hídrica, fija los metal(oid)es en la rizosfera vegetal y permite mejorar la estética del paisaje [3].

En el proceso de selección de las especies más adecuadas para el fitomanejo de balsas mineras, los aspectos ecofisiológicos son especialmente importantes en territorios áridos y semiáridos como el sureste de España, en los que las especies colonizadoras deben tolerar no sólo la contaminación, sino también el estrés hídrico debido a las sequías extremas, circunstancia que se prevé que se agrave a consecuencia del cambio climático [5]. Por ello la combinación de especies autóctonas adaptadas a las condiciones climáticas locales y con funcionalidades ecológicas complementarias resulta de vital importancia [4, 6]. Así, las especies herbáceas (gramíneas o arbustivas de bajo porte) juegan un papel muy importante durante las etapas de sucesión primaria de colonización [7]. Sin embargo, la sostenibilidad a largo plazo en un proceso de fitomanejo de balsas mineras requiere del desarrollo de comunidades vegetales estables, en las cuales la presencia de especies arbóreas juega un papel crítico [8]. Paralelamente, los organismos y microorganismos edáficos juegan un papel clave en los procesos biogeoquímicos del suelo, fundamentalmente aquellos relacionados con el ciclo de materia orgánica y nutrientes [9].

El empleo de enmiendas orgánicas para mejorar las condiciones edáficas se considera una herramienta de ayuda para la mejora de las propiedades edáficas (incluyendo la microbiología) y la consolidación de la vegetación en las balsas mineras [10]. Numerosos estudios han indicado la idoneidad del biochar para la regeneración de suelos contaminados debido a su elevada capacidad para adsorber y secuestrar metales o a la mejora en la eficiencia en el uso de nutrientes y agua por parte de las plantas [11]. A diferencia de las enmiendas tradicionales, como estiércoles o composts, el biochar es estable en el suelo, lo que en proyectos de restauración a largo plazo contribuye, además, a la lucha contra el cambio climático al secuestrar carbono en el suelo [12].

El objetivo general de la tesis doctoral es estudiar el efecto del biochar (sólo y en combinación con otra enmienda orgánica) sobre el comportamiento biogeoquímico y la toxicidad de residuos mineros y si dicho efecto puede favorecer el papel de *Pinus halepensis* y *Tetraclinis articulata* como especies clave para la restauración de balsas mineras abandonadas.

Los objetivos específicos se concretan en:

1. Valorar en qué medida la presencia de especies arbóreas en residuos mineros mejora las condiciones de éstos, llevando a procesos de facilitación que contribuyan a desencadenar la colonización y sucesión vegetal que conduzcan a la regeneración del ecosistema.
2. Valorar la efectividad del biochar (sólo y en combinación con otra enmienda orgánica) para la mejora de las propiedades edáficas de los residuos mineros y si dichas mejoras contribuyen a reducir la movilización (agua de poro) y dispersión (lixiviados) de los metales/metaloides presentes en dichos residuos.
3. Valorar en qué medida los cambios provocados en residuos mineros a consecuencia de la adición de biochar (sólo y en combinación con otra enmienda orgánica) pueden modificar

la toxicidad de la solución (agua de poro) y los lixiviados, utilizando semillas, plántulas e invertebrados edáficos como bioindicadores.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Trabajo de campo

El objetivo del trabajo de campo es describir la dinámica de metal(oides) asociada al crecimiento de especies arbóreas en balsas mineras. Para ello se llevará a cabo un muestreo estacional de ecología de especies vegetales asociadas a *P. halepensis* y *T. articulata* en balsas mineras. Además se realizará la toma de muestras de suelo, hojarasca y planta para su posterior caracterización analítica.

2.2 Trabajo de invernadero/laboratorio

El objetivo del trabajo del invernadero/laboratorio es determinar los efectos del empleo de biochar, sólo y en combinación con enmiendas orgánicas, en el crecimiento de especies arbóreas y la ecotoxicidad de metal(oides) en residuos mineros.

Por una parte se llevará a cabo el diseño, la preparación y el desarrollo de un experimento en columnas con dos especies arbóreas (*P. halepensis* y *T. articulata*) reproduciendo una situación de adición de enmiendas orgánicas en las balsas mineras para facilitar el crecimiento de las plantas y promover la formación de islas de fertilidad como punto de partida de la colonización vegetal y la recuperación del ecosistema (Fig. 1). Se muestrearán y analizarán periódicamente la solución edáfica mediante sondas Rhizon y los drenajes de cada maceta, así como parámetros de crecimiento de las plantas. Además, se realizarán bioensayos de ecotoxicidad con semillas, plántulas e invertebrados edáficos.

3. RESULTADOS ESPERADOS

Los resultados esperados del proyecto son los siguientes:

- La presencia de especies arbóreas creciendo en las balsas mineras favorecerá unos mayores índices de biodiversidad y mejores propiedades edáficas.
- La adición de biochar a los residuos mineros mejorará sus propiedades edáficas y en consecuencia permitirá un mejor crecimiento de las especies arbóreas.

4. AGRADECIMIENTOS

Este proyecto ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad y FEDER (CGL2014-54029-R) y la Fundación Séneca de la Región de Murcia (19248/PI/14). Obdulia Martínez disfruta de un contrato FPI (BES-2015-075838) del Ministerio de Economía y Competitividad.

5. REFERENCIAS

- [1] Conesa, H.M., Jiménez, F.J. (2007). The Mar Menor lagoon (SE Spain): a singular natural ecosystem threatened by human activities. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 839-879.
- [2] 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. Monitor.* 12, 1225-1233.
- [3] Robinson, F.H., Bañuelos, G., Conesa, H.M., Evangelou, M.W., Schulin, R. (2009). The phytomanagement of trace elements in soils. *Crit. Rev. Plant Sci.* 28, 240-266.

- [4] Párraga-Aguado, I., González-Alcaraz, M.N., Álvarez-Rogel, J., Jiménez-Cárceles, F.J., Conesa, H.M. (2013). The importance of edaphic niches and pioneer plant species succession for the phytomanagement of mine tailings. *Environ. Pollut.* 176, 134-143.
- [5] Forzieri, G., Feyen, L., Rojas, R., Flörke, M., Wimmer, F., Bianchi, A. (2014). Ensemble projections of future streamflow droughts in Europe. *Hydrol. Earth Syst. Sc.* 18, 85-108.
- [6] Párraga-Aguado, I., González-Alcaraz, M.N., Álvarez-Rogel, J., Conesa, H.M. (2014). Assessment of the employment of halophyte plant species for the phytomanagement of mine tailings in semiarid areas. *Ecol. Eng.* 71, 598-604.
- [7] Párraga-Aguado, I., Querejeta, J.I., 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. Manage.* 133, 51-58.
- [8] Bonanomi, G., Incerti, G., Mazzoleni, S. (2011). Assessing occurrence, specificity, and mechanisms of plant facilitation in terrestrial ecosystems. *Plant Ecol.* 212, 1777-1790.
- [9] Lavelle, P., Bignell, D., Lepage, M., Wolters, W., Roger, P., Ineson, P., Heal, O.W., Dhillon, S. (1997). Soil function in changing world: the role of invertebrate ecosystem engineers. *Eur. J. Soil Biol.* 33, 159-193.
- [10] Wong, M.H. (2003). Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere* 50, 775-80.
- [11] Beesley, L., Moreno-Jiménez, E., Gomez-Eyles, J.L. (2010). Effects of biochar and greenwaste compost amendments on mobility, bioavailability and toxicity of inorganic and organic contaminants in a multi-element polluted soil. *Environ. Pollut.* 158, 2282-2287.
- [12] Lehmann, J. (2007). A handful of carbon. *Nature* 447, 143-144.

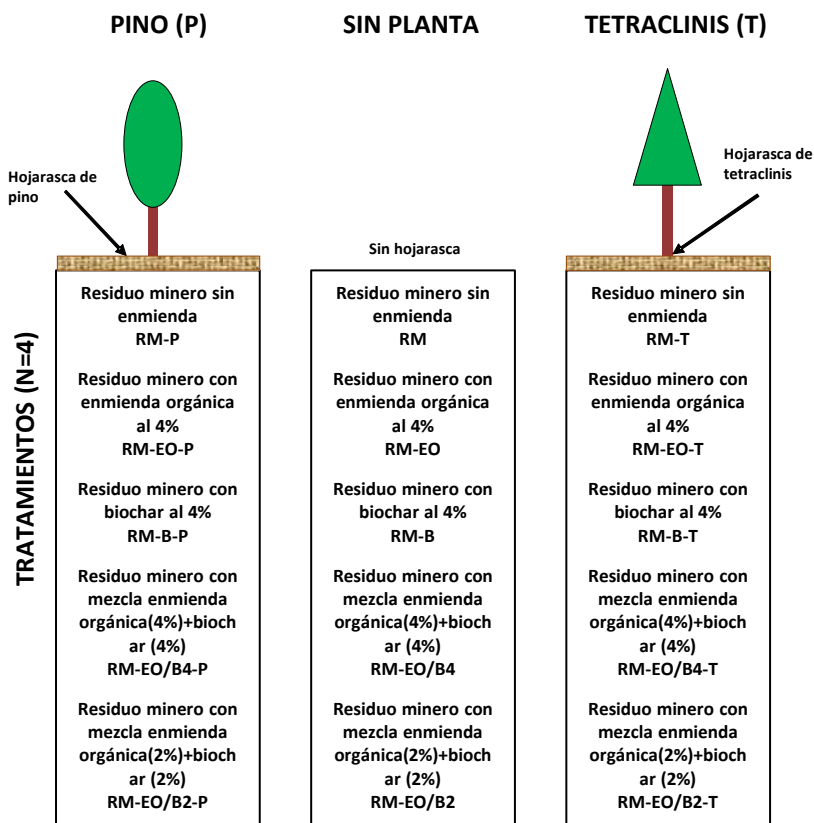


Figura 1. Esquema de tratamientos a ensayar en invernadero.

Proceedings of the 5th WORKSHOP ON AGRI-FOOD RESEARCH



**Escuela Técnica
Superior de
Ingeniería
Agronómica**



Advanced Techniques in Food and Agricultural Research and
Development – Doctorate Program