



ETSia

Escuela Técnica  
Superior  
de Ingeniería  
Agronómica

# ACTAS DEL III WORKSHOP EN INVESTIGACIÓN



WIA 3:14



Universidad  
Politécnica  
de Cartagena

---

# Actas del III Workshop en Investigación Agroalimentaria

- WiA 3.1-

---

Programa de Doctorado en  
Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario.

## Editores y Comité Científico Organizador

Dr. Francisco Artés-Hernández  
Dr. Marcos Egea Gutiérrez-Cortines  
Dr. Alfredo Palop Gómez  
Dr. Sebastián Bañón Arias  
Dr. Pablo Bielza Lino

## **Agradecimientos**

El Comité Organizador agradece a la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica –ETSIA- y al Instituto de Biotecnología Vegetal –IBV- de la UPCT la ayuda prestada para que este evento se haya podido realizar. Al Campus Mare Nostrum – CMN- la difusión realizada del mismo. Se agradece igualmente la financiación recibida del Vicerrectorado de Investigación e Innovación y del Vicerrectorado de Tecnologías de la Información y las Comunicaciones de la UPCT para su realización. Igualmente queremos agradecer a la Concejalía de Turismo Ayuntamiento de Cieza el material gráfico aportado al Programa.

**Copyright: Programa de Doctorado en TAIDA.**

**Edita: Universidad Politécnica de Cartagena**

**Servicio de Documentación**

**(1º edición 2014)**

**Plaza del Hospital, 1**

**30202, Cartagena**

**Tel. 968325908**

Correo-e: [servicio.documentacion@bib.upct.es](mailto:servicio.documentacion@bib.upct.es)

ISBN: 978-84-697-1358-7

Depósito Legal: MU-984-2014

## **Editores y Comité Científico Organizador**

**Dr. Francisco Artés-Hernández**

**Dr. Marcos Egea Gutiérrez-Cortines**

**Dr. Alfredo Palop Gómez**

**Dr. Sebastián Bañón Arias**

**Dr. Pablo Bielza Lino**

**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)**

## Prólogo

Como Presidente del Comité Organizador del III Workshop en Investigación Agroalimentaria (WiA 3.14) y Coordinador del Programa de Doctorado en Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (TAIDA), me satisface enormemente ver plasmado en este Libro de actas las excelentes presentaciones efectuadas por los doctorandos del Programa. Muestran un gran interés científico y reflejan el elevado potencial de los Grupos Investigadores pertenecientes a los diversos Centros que se integran en el Programa de Doctorado en TAIDA [UPCT, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC) y el Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA)]. Pretendemos que durante la celebración de estas Jornadas se favorezca la convivencia e intercambio de experiencias entre los doctorandos del Programa, Grupos de Investigación, profesores, investigadores, técnicos, etc...

El programa científico se ha estructurado en cuatro sesiones: Biotecnología Agroalimentaria, Tecnología e Ingeniería de Alimentos, Tecnología e Ingeniería de la Producción Vegetal e Ingeniería Agroforestal, en función de los diversos temas de interés relacionados con la Agroalimentación y que son objeto de investigación por los Grupos que conforman el Programa. Hemos contado igualmente con tres conferencias invitadas de carácter general encaminadas a fortalecer los conocimientos que están adquiriendo los investigadores en formación durante esta etapa y consideramos de mucha utilidad para el resto de investigadores. Desde el Comité Científico Organizador consideramos que es necesario que los doctorandos realicen este tipo de actividades formativas para adquirir las competencias típicas de un Doctor entre las que destacan saber resumir los resultados, resaltar lo importante de los mismos, presentarlos y darlos a conocer de manera clara y concisa a un público heterogéneo en un tiempo limitado, como sucede habitualmente en las presentaciones de trabajos de investigación a Congresos científicos.

Agradecer, en nombre del Comité Organizador, la participación de los doctorandos y directores de Tesis, así como la alta calidad de las ponencias presentadas.

**Dr. Francisco Artés-Hernández**

# ÍNDICE

## Conferencias Invitadas:

- **2014-2020: horizonte 2020 y la estrategia española de ciencia, tecnología e innovación.** **Pág. 11**  
Dr. Juan María Vázquez Rojas  
Director general de investigación científica y técnica del Ministerio de Economía y Competitividad - MINECO (2012- 2014). Catedrático de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Murcia
  
- **Retos de la alimentación y la agricultura en el siglo XXI** **Pág. 12**  
Dr. José M<sup>a</sup> García Álvarez-Coque  
Catedrático de la ETSIAMN de la Universidad Politécnica de Valencia. Expresidente de la Asociación Española de Economía Agraria
  
- **Uso de las herramientas Web 2.0 para la divulgación de la horticultura: el caso de Wikipedia** **Pág. 13**  
Dr. Angelo Signore  
Dipartimento di Scienze Agro- Ambientali e Territoriali de la Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", Italia. Miembro de la sociedad italiana de ciencias horticolas.

## Índice de trabajos

<b>Sesión I: Tecnología e Ingeniería de Alimentos</b>	<b>Pág. 14</b>
<b><i>Continuous and Conventional Microwave Heating Effects on the Antioxidant Capacity of Tomato Juice</i></b>	<b>Pág. 15</b>
<i>M. Arjmandi, E. Aguayo, M. Otón, F. Artés</i>	
<b><i>Mapeo varietal de fitoprostanos en almendras: identificación y cuantificación</i></b>	<b>Pág. 19</b>
<i>A.M. Carrasco del Amor, J. Collado-González, A. Gil-Izquierdo, E. Aguayo</i>	
<b><i>Determination of genes involved in heat resistance response of C. sakazakii</i></b>	<b>Pág. 22</b>
<i>J.P. Huertas, M. Ros, M. Esteban, A. Palop, C. Hill, A. Álvarez</i>	
<b><i>Uso de plantas comestibles silvestres como ingredientes funcionales en la dieta moderna</i></b>	<b>Pág. 26</b>
<i>A. Romojaró, M. A. Botella, C. Obón, M. T. Pretel</i>	
<b><i>Degradación térmica del <math>\gamma</math>-orizanol en pastas sin gluten</i></b>	<b>Pág. 30</b>
<i>S. Soto, M. Boluda, A. López</i>	
<b><i>Efecto combinado de nisina y D-limoneno sobre listeria monocytogenes aplicados mediante nanoemulsiones"</i></b>	<b>Pág. 34</b>
<i>J. Maté, P. M. Periago, A. Palop</i>	
<b><i>Calidad de dátiles tunecinos "Deglet Noor" sometidos a baños térmicos como alternativa al bromuro de metilo</i></b>	<b>Pág. 38</b>
<i>R. Ben Amor, E. Aguayo, M.D. de-Miguel</i>	
<b><i>Agrupamiento jerárquico de compuestos individuales de aroma en melón "Piel de Sapo" y la línea casi isogénica SC3-5-1</i></b>	<b>Pág. 42</b>
<i>L.A. Chaparro-Torres, J.P. Fernández-Trujillo</i>	
<b><i>La combinación del riego deficitario y técnicas de curado mejoran la calidad de la nectarina extratemprana</i></b>	<b>Pág. 46</b>
<i>N. Falagán, F. Artés, P.A. Gómez, F. Artés-Hernández, J.M. de la Rosa, E. Aguayo</i>	
<b><i>Evolución del contenido en vitamina C de brócoli mínimamente procesado en fresco desinfectado con agua electrolizada y bajo recubrimientos comestibles</i></b>	<b>Pág. 50</b>
<i>J. Navarro-Rico, G.B. Martínez-Hernández, P. Gómez, M. Otón, F. Artés, F. Artés-Hernández</i>	
<b><i>Efecto de la temperatura sobre la acumulación de carotenoides en frutos de tomate en diferentes estados de desarrollo</i></b>	<b>Pág. 54</b>
<i>V. Hernández, P. Hellín, J. Fenoll, M.V. Molina, J. Cava, I. Garrido, P. Flores.</i>	
<b><i>Efecto de agentes desinfectantes alternativos al hipoclorito sódico en la calidad de habas mínimamente procesadas en fresco</i></b>	<b>Pág. 58</b>
<i>M. Otón, F. Artés, F. Artés-Hernández</i>	
<b><i>Efecto de las altas presiones de homogeneización versus pasteurización en un complemento nutracéutico rico en hierro</i></b>	<b>Pág. 62</b>
<i>A. García-González, M.P. Tarazona-Díaz, P.A. Gómez, E. Aguayo</i>	
<b>Sesión II: Biotecnología Agroalimentaria</b>	<b>Pág. 66</b>
<b><i>Patrones de expresión de sistemas antioxidantes en plantas pioneras presentes en balsas de estériles contaminadas con altas concentraciones de metales pesados</i></b>	<b>Pág. 67</b>
<i>A. López-Orenes, M.A. Ferrer, A.A. Calderón</i>	
<b><i>Evolución del crecimiento y la eficiencia alimentaria en conejos de engorde en función de la línea genética, la formulación de la dieta y del género</i></b>	<b>Pág. 71</b>
<i>A. Martínez-Bas, E. Armero, M. Kessler</i>	
<b><i>"Itumsix", la nueva variedad tardía de uva de mesa blanca</i></b>	<b>Pág. 75</b>
<i>M. Torne, J. Carreño</i>	

<b>Quantitative evaluation of bias in barcode markers derived from complex samples</b>	Pág. 78
<i>M. Pawluczyk, J. Weiss., Matthew G. Links, M. E. Aranguren, M. D. Wilkinson, M. Egea-Cortines</i>	
<b>'SIROCO 5 ®' El primer paraguayo en el mercado</b>	Pág. 82
<i>A. Carrillo-Navarro, A. Guevara-Gazquez, J. Cos-Terrer</i>	
<b>Effect of the geographical origin on the presence of skeletal deformities and swimbladder anomaly in a cultured gilthead sea bream (<i>Sparus aurata</i> L) population</b>	Pág. 85
<b>Estimation of genetic parameters</b>	
<i>M. García-Celdrán, Z. Cutáková, G. Ramis, E. Armero</i>	
<b>Selección de nuevas variedades de vid resistentes a enfermedades fúngicas, generadas mediante cruzamientos con <i>Monastrell</i></b>	Pág. 89
<i>B. García, A. Fuentes, J.A. Martínez, C. Egea, A. Martínez-Cutillas, L. Ruiz-García</i>	
<b>Comportamiento de patrones de cerezo en las condiciones edafoclimáticas de la Región de Murcia.</b>	Pág. 92
<i>G. López-Ortega, F. García, C. Frutos, A. Bayo-Canha, D. López, D. López-Romero, D. Frutos</i>	
<b>Sesión III: Tecnología e Ingeniería de la Producción Vegetal</b>	Pág. 99
<b>Línea base de susceptibilidad y selección de poblaciones resistentes de <i>Tuta absoluta</i> (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)</b>	Pág. 100
<i>L. García-Vidal, M.R. Martínez-Aguirre, P. Bielza</i>	
<b>Susceptibilidad de poblaciones europeas de <i>Tuta absoluta</i> (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) a insecticidas y respuesta a la selección</b>	Pág. 104
<i>M.R. Martínez-Aguirre, L. García-Vidal, P. Bielza</i>	
<b>Estudio técnico-jurídico de los residuos de la minería metálica en relación a la normativa de residuos y suelos contaminados: el caso español</b>	Pág. 108
<i>M.G. Rosique-López, G. García-Fernández, T.M. Navarro-Caballero</i>	
<b>Variabilidad de la tolerancia a insecticidas en distintas poblaciones mediterráneas de <i>Orius laevigatus</i> (Fieber) (Hemiptera: Anthoridae).</b>	Pág. 112
<i>V. Balanza, J.E. Mendoza, P. Bielza</i>	
<b>El número de goteros por maceta afecta a la distribución de raíces y sales en el sustrato en gerbera</b>	Pág. 116
<i>R. Valdés, J. Ochoa, J.A. Franco, M. J. Sánchez-Blanco, S. Bañón</i>	
<b>Consolidación biomecánica de <i>Ficus macrophylla</i> monumentales en la reforma de la plaza de San Francisco de Cartagena: Resultados preliminares</b>	Pág. 120
<i>M.A. Guillén Pérez, J.A. Franco, J. Ochoa</i>	
<b>Identificación de compuestos con actividad biológica e interés en agronomía en exudados radiculares</b>	Pág. 124
<i>R. Pérez-Santamarina, A. Gómez-Cadenas</i>	
<b>Villas y Casas del Campo de Cartagena</b>	Pág. 128
<i>M. Ortega, J.I. Manteca, J. Calvo</i>	
<b>Caracterización genética de la resistencia a <i>Meloidogyne incognita</i> de la línea de pimiento P26</b>	Pág. 132
<i>F. Sánchez-Solana, C. Ros-Ibáñez, M.C. Martínez, A. Lacasa</i>	
<b>Efecto de las PGPR en la producción y vida útil del berro (<i>Nasturtium officinale</i>) cultivado en bandejas flotantes</b>	Pág. 135
<i>D. Niñirola, S. Nicola, G. Pignata, C. Egea-Gilaber, J.A. Fernández</i>	
<b>Efectos de la sobreproducción de ácido abscísico y citoquininas en la respuesta fisiológica y agronómica de tomate bajo estrés salino en invernadero</b>	Pág. 139
<i>A. Martínez-Pérez, A. Albacete, M.P. Sánchez-Iglesias, F. Pérez-Alfocea, C. Martínez-Andújar</i>	
<b>Contracción temprana del diámetro del tronco. Un nuevo indicador altamente sensible al déficit hídrico en nectarino extratemprano</b>	Pág. 143
<i>J.M. de la Rosa, M.R. Conesa, R. Domingo, A. Pérez</i>	

<b>Resistencias cruzadas de poblaciones seleccionadas a ciantraniliprol y spiromesifen frente a otros insecticidas</b>	Pág. 147
<i>C. Grávalos, E. Fernández, I. Moreno, A. Belando, P. Bielza</i>	
<b>Estudio de lixiviación de nitratos en invernaderos de pimiento biosolarizados</b>	Pág. 151
<i>P. Fernández, J.A. Pascual, A. Lacasa</i>	
<b>Variabilidad de la tolerancia a la alimentación sin presas en distintas poblaciones mediterráneas de <i>Orius laevigatus</i> (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae)</b>	Pág. 155
<i>J. E. Mendoza, V. Balanza, M. J. Sánchez-Martínez, P. Bielza</i>	
<b>Ciclo de vida de <i>Allium chrysonemum</i> y efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la floración</b>	Pág. 160
<i>E. Martínez-Díaz, J.J. Martínez-Sánchez, F. J. Segura, M. Aguado, S. Bañón, M. J. Vicente</i>	
<b>Plant water status indicators for detecting water stress in pomegranate trees</b>	Pág. 163
<i>A. Galindo, P. Rodríguez, S. Ondoño, J. Collado-González, A. Moriana, Z.N. Cruz, F. Moreno, A. Torrecillas</i>	
<b>Programación del riego en uva de mesa cv. <i>Crimson Seedless</i> a partir de indicadores de planta</b>	Pág. 167
<i>M.R. Conesa, A. Pérez-Pastor, R. Domingo</i>	
<b>Balance de agua y nitrógeno en un cultivo de pimiento grueso en el Campo de Cartagena</b>	Pág. 171
<i>J. Navarro, F.M. del Amor, J. Cánovas</i>	
<b>Composition and depth of Extensive Green Roof substrate affect the growth of two Mediterranean plant species under different irrigation conditions.</b>	Pág. 175
<i>S. Ondoño, J.J. Martínez, J.L. Moreno</i>	
<b>Gradientes edáficos y microbiológicos en balsas mineras de la sierra de Cartagena-La Unión</b>	Pág. 179
<i>I. Párraga-Aguado, M.N. González-Alcaraz, J. Álvarez-Rogel, F.J. Jiménez-Cárceles, H.M. Conesa</i>	
<b>Protective effects of arbuscular mycorrhizae on laurustinus plants irrigated with treated wastewater under field conditions</b>	Pág. 183
<i>MJ. Gómez-Bellot, MF. Ortuño, P. Nortes J. Vicente- Sánchez, MJ. Sánchez-Blanco</i>	
<b>Influencia de distintos manejos del suelo sobre la actividad edáfica, la materia orgánica y la producción de una finca de ciruelo ecológico en el área mediterránea</b>	Pág. 187
<i>C. Chocano, T. Hernández, D. González, J. Melgares de Aguilar, C. García</i>	
<b>Respuesta del limonero 'Fino 49' al riego deficitario. Efectos sobre el crecimiento, la producción y la calidad del fruto.</b>	Pág. 191
<i>J.M. Robles, J.G. Pérez-Pérez, P. Botía</i>	
<b>Aplicación de estrategias de riego deficitario controlado en albaricoquero</b>	Pág. 195
<i>F. Pérez-Sarmiento, R. Alcobendas, O. Mounzer, E. Nicolás, J.J. Alarcón</i>	
<b>Could recently locally extinct population patches of <i>Astragalus nitidiflorus</i> regenerate from the soil seed bank</b>	Pág. 199
<i>F. Segura, J.J. Martínez-Sánchez, M. Aguado, J.A. Franco, M. J. Vicente</i>	
<b>Efecto del estrés hídrico en un cultivo en invernadero de pimiento injertado</b>	Pág. 203
<i>A. Gálvez López, J. López-Marín</i>	
<b>La aportación de las Villas Rurales a la formación del paisaje de la región de Murcia</b>	Pág. 207
<i>F. Medina, J. Ochoa</i>	
<b>Sesión IV: Ingeniería Agroforestal</b>	Pág. 211
<b>Análisis de la variabilidad espacial y temporal de la precipitación en la provincia de Tungurahua, Ecuador, para una mejor planificación agrícola</b>	Pág. 212
<i>J.E. Hunink, W.W. Immerzeel, A. Baille, P. Droogers</i>	
<b>Análisis de sensibilidad en la construcción de ensambles de RCMs de variables meteorológicas</b>	Pág. 216
<i>P. Olmos, S. García, J.D. Giraldo</i>	
	Pág. 220



<b>Estimación de la profundidad radicular de cultivos hortícolas a partir de imágenes de la cubierta vegetal para su empleo en gestión del riego</b>	Pág. 220
<i>D. Escarabajal-Henarejos, J.M. Molina-Martínez, G. García-Mateos, A. Ruiz-Canales</i>	
<b>Economic analysis of alternatives for eliminating aquifer overdraft in the Segura basin</b>	Pág. 224
<i>D. Martínez-Granados, J. Calatrava</i>	
<b>Diseño y puesta en marcha de una Infraestructura de Datos Espacial sobre Agricultura y Agua.</b>	Pág. 228
<i>M. Erena, S. García</i>	
<b>Reference evapotranspiration of screenhouse-grown crops</b>	Pág. 232
<i>E. Kitta, A. Baille, N. Katsoulas, N. Rigakis</i>	

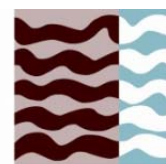
## Sesión Pósters

<b>Modelización y optimización de sistemas de autoenfriamiento de envases alimentarios por adsorción a vacío</b>	Pág. 237
<i>E. Hernández, A. López, A. Esnoz</i>	
<b>Genotipado, análisis fenotípico y transcriptómico de accesiones seleccionadas de <i>Vicia faba</i>, <i>Pisum sativum</i> y <i>Vigna unguiculata</i></b>	Pág. 238
<i>M.V. Ruiz-Hernández, J. Weiss, C. Egea-Gilabert, M. Egea-Cortines, J.A. Fernández, J. Esteva</i>	
<b>Resistencia a insecticidas en <i>Myzus persicae</i>: estados de resistencia y mecanismos implicados</b>	Pág. 243
<i>A. Belando, I. Moreno, P. Bielza</i>	
<b>Mecanismos de resistencia a insecticidas y costes ecológicos de adaptación en <i>Bemisia tabaci</i> (<i>Gennadius</i>)</b>	Pág. 247
<i>I. Moreno, A. Belando, P. Bielza</i>	
<b>Factores de susceptibilidad al virus del mosaico del pepino dulce (<i>Pepino mosaic virus</i>, <i>PepMV</i>): Identificación, caracterización de su papel en la biología del virus y uso como dianas de mejora de resistencias</b>	Pág. 251
<i>F. Ruiz-Ramón, M. Aranda</i>	
<b>Ciclos biogeoquímicos en humedales con diferente grado de eutrofización y su relación con factores de cambio climático: resultados experimentales en mesocosmos</b>	Pág. 255
<i>M.C. Tercero-Gómez, J. Álvarez-Rogel, M.N. González-Alcaraz</i>	
<b>Evaluación y gestión sostenible de los espacios verdes urbanos a través de los servicios proporcionados por su ecosistema</b>	Pág. 258
<i>S. Gómez, F. Alcón</i>	
<b>Satellite-based Algorithms for Estimating Actual Evapotranspiration. Application to irrigation management and water accounting in the Segura basin</b>	Pág. 263
<i>J.A. Martínez, S.G. García Galiano, A. Baille</i>	
<b>Estudio de la depuración de las aguas. Caso de estudio de la Región de Murcia</b>	Pág. 266
<i>A. Montesinos, M.D. de-Miguel</i>	

## Organizadores



Universidad  
Politécnica  
de Cartagena



**ETSIA**  
Escuela Técnica  
Superior de  
Ingeniería  
Agronómica

## Colaboradores





# Ponencias Invitadas

## **LAS CLAVES EN LA ESTRATEGIA ESPAÑOLA DE CIENCIA, TECNOLOGÍA Y DE INNOVACIÓN**

**Juan María Vázquez Rojas**

Catedrático de Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.  
Vazquez@um.es

### **RESUMEN**

Las nuevas Estrategias Españolas de Ciencia, Tecnología y de Innovación, aprobada por el Consejo de Ministros durante el 2013 tras el acuerdo de todas las administraciones nacionales y autonómicas, contempla a la Universidad y su actividad en el ámbito de la formación, la investigación y la transferencia, como un agente indispensable para llevar a término las políticas científicas en el periodo 2014-2020, un periodo que se va a caracterizar por la necesidad de articular con eficiencia todos los programas, autonómicos, nacionales y europeos en esta materia. Las Estrategias Españolas Ciencia, Tecnología y de Innovación se caracterizan por 1) entender que investigación e innovación deben compartir unos objetivos comunes; 2) promover la excelencia científica, identificando tanto los grandes centros de investigación, como la investigación en red como la de grupos de excelencia distribuidos por todo el país. 3) facilitar la colaboración público privada y en el que la circulación del conocimiento se establezca del modo más flexible posible; 4) incentivar la internacionalización del sistema con una estrategia que permite desarrollar una estrategia conjunta con instrumentos internacionales y, especialmente, con Horizonte 2020. 5) promover la movilidad intersectorial, interdisciplinar e internacional; 6) impulsar la cultura científica, la actitud emprendedora y la creación de start-up; 7) desarrollar procedimientos, más allá de la financiación directa, que se extienda desde medidas fiscales incentivadoras, políticas de mecenazgo, de emprendimiento o de extranjería; 8) especializar y amortiguar las desigualdades entre regiones y 9) poner a las personas al frente de los objetivos de las políticas y priorizar las convocatorias de recursos humanos.

**Palabras clave:** I+D; movilidad; excelencia; colaboración; internacionalización.

## RETOS DE LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA EN EL SIGLO XXI

**José María García Álvarez-Coque**

Universitat Politècnica de València, ETSIAMN, Edificio 3B, Campus de Vera s/n, 46022, Valencia, España, jmgarcia@upv.es

### RESUMEN

El planeta se enfrenta al reto de alimentar a una población creciente en un presente y futuro de limitación de recursos, cadenas de valor imperfectas, crisis de alimentos, y población rural vulnerable. Se hace más necesaria que nunca una reflexión sobre las alternativas de la agricultura y la alimentación, vistas como solución a los desafíos socio-económicos y ambientales. Una tesis ampliamente aceptada y admitida a nivel político es que para alimentar a la población mundial en 2050 se estima que la producción agrícola tendrá que aumentar en un 60 por ciento. Esta cifra se suele tomar como objetivo normativo cuando se evalúa el crecimiento de la producción necesario en las próximas décadas. A la vez, el objetivo se transforma en un discurso útil para quienes abogan por un aumento de la producción como principal salida del problema del hambre. Sin embargo, no resulta evidente que exista una relación directa entre la cantidad de alimentos producidos y el número de personas que sufre hambre a nivel global. Sobre la capacidad del planeta de alimentar a la población, existen paradigmas que representan intereses habitualmente en conflicto. Desde la prevalencia del ámbito científico, y el reconocimiento de las consecuencias económicas y sociales de las decisiones políticas, la ponencia defiende una coexistencia de paradigmas que permitan aportar soluciones a los problemas de seguridad y soberanía alimentarias. Todo ello desde un enfoque de colaboración entre distintos enfoques metodológicos, el respeto a las mejores prácticas del conocimiento, estén dentro o fuera de la universidad, y un espíritu de provisionalidad.

**Palabras clave:** Seguridad alimentaria; agricultura mundial; políticas agrarias.

## EL USO DE LAS HERRAMIENTAS WEB 2.0 EN LA DIVULGACIÓN DE LA HORTICULTURA.

**Angelo Signore**

Dipartimento di Scienze Agro-Ambientali e Territoriali, Università degli Studi di Bari “Aldo Moro”. Italia.

### RESUMEN

Las herramientas Web 2.0 han entrado en la vida diaria de las personas, y se utilizan para las actividades más diferentes. En el ámbito académico son utilizadas de varias formas: para los cursos, para revisar artículos científicos y para mejorar las actividades de investigación y divulgación. Unas de las herramientas 2.0 más eficaces es Wikipedia, una enciclopedia libre disponible en la web. Dentro de un proyecto cuyo objetivo es recuperar la biodiversidad agrícola, hemos utilizado Wikipedia para crear (o modificar) algunos artículos relacionados con diversas especies hortícolas (tomate, melón, brócoli, zanahoria) incluidas en el proyecto. Igualmente, hemos analizado algunos parámetros, en particular la tendencia del número de visitantes en los artículos de Wikipedia, referral de las páginas de Wikipedia hacia el sitio web institucional del proyecto y la posibilidad de realizar un artículo destacado en Wikipedia. Los resultados más importantes fueron los siguientes:

- Wikipedia puede ser un excelente punto de inicio para recopilar, actualizar y compartir información sobre temas agrícolas.
- Una forma para superar la desconfianza por parte del mundo académico hacia Wikipedia, podría ser incluir referencias científicas relativas a los artículos ya publicados en revistas científicas.
- Wikipedia no es un antagonista de las revistas científicas. Al contrario, puede ser una herramienta útil para facilitar la entrada de los visitantes hacia el contenido de las mismas.
- La utilidad de Wikipedia para quien busque información científica depende de la integridad de la información, de la experiencia de los autores que han escrito la voz y de las referencias.

**Palabras clave:** I+D; información; base de datos; internet; libre acceso.

SESIÓN I



Tecnología e Ingeniería  
de Alimentos

RESÚMENES

## Continuous and Conventional Microwave Heating Effects on the Antioxidant Capacity of Tomato Juice

**M. Arimandi<sup>(1,3)</sup>, E. Aguayo<sup>(2,3)</sup>, M. Otón<sup>(2)</sup>, F. Artés<sup>(2,3)</sup>**

<sup>(1)</sup> College of Agriculture & Natural Resource. University of Tehran. Karaj. Iran. mitra.arjmandi@ut.ac.ir

<sup>(2)</sup> Unidad Calidad Alimentaria y Salud. Instituto de Biotecnología Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). Campus Muralla del Mar. 30202 Cartagena, España.

<sup>(3)</sup> Grupo de Postrecolección y Refrigeración. Dpto. Ingeniería de Alimentos. ETSIA-UPCT. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena, España.

### Abstract

Thermal processing extends the shelf life of fruits and vegetables by inactivating microorganisms and enzymes. The efficacy of heating depends on the properties of the food and mainly on the processing parameters. The microwave (MW) oven offers several advantages for keeping overall quality and safety of the foods products. A continuous MW oven is a new tool which can make the cooking process of plant products shorter. The present work evaluates the effect of a new industrial continuous MW oven at different heating powers (750, 900 and 1050 W) and times (from 120 to 420 s) on the antioxidant capacity of tomato juice. This treatment was compared to other tomato juice heated in a conventional MW oven (750 and 900 during 60 to 150 s). As control non heated juice was used. The results showed that the antioxidant capacity was lowered by the heating. In general, as longer the duration and higher the power applied the lower antioxidant capacity was found. However, a moderate high power dose (900 W) combined with shorter duration (120 or 150 s) kept better the antioxidant capacity than low power MW dose (750 W) combined with high treatment duration (360 or 420 s). At similar doses (time/power) the industrial MW provided a slightly lower antioxidant capacity than conventional MW. As main conclusion, when comparing the efficacy of the continuous MW oven versus the conventional one no advantage for keeping the antioxidant capacity of tomato juice was found.

**Keywords:** Thermal treatment; Quality; FRAP

### 1. Introduction

Fruits and vegetables are very good and cheap sources of natural bioactive compounds like antioxidants of interest for the human diet. These antioxidants include carotenoids, vitamins, flavonoids, other phenolic compounds, dietary glutathione, and endogenous metabolites [1,2,3]. Tomato is a very popular vegetable and has a great importance in food by their content in vitamins, lycopene, and organic acids. All tomato products (juice, ketchup, sauce, puree, paste and soup) have antioxidant characteristics determined by the presence of bioactive compounds. One of the most popular options for consuming tomatoes is tomato juice because is easy to drink, tasty, and filled with health benefits. Color and flavor are the most important quality attributes of tomato juice that influence the consumer's choice. These are usually prepared by thermal or dehydration processing and then packaged and stored. These thermal processes would certainly bring

about a number of changes in physical characteristics and chemical composition of products [3, 4, 5, 6]. Regarding food quality and safety some of these changes are undesirable and must be minimized.

The purpose of thermal processing is to extend the shelf-life of food products without compromising food quality and safety. In addition consumers demand the maximum preservation of the endogenous sensory, nutritional and health related qualities of products they eat. Short microwave (MW) treatment may be a solution to achieve this purpose. In comparison with conventional heating methods, the MW oven offers a rapid and relatively uniform heating, high energy efficiency, saving, reduced space utilization, precise process control, fast start-up, shut-down conditions and high overall quality and safety of the final product. MW thermal processing has been a major processing technology in the food industry because it gives the opportunity to have a fast thermal process,



including in a continuous mode [7]. MW has been successfully used to heat, dry, pasteurize and sterilize many food products [8, 9]. High-quality retention of product and antioxidant activity has been reported using 915 MHz MW [8]. Nowadays thermal treatment of plant derived foods by MW oven is convenient and very popular all around the world.

The objective of this study was to investigate the comparative effects on antioxidant activity of tomato juice heated by mean of a conventional discontinuous MW oven and an innovative continuous MW oven. As far as we know this kind of study is firstly reported here.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Plant Material

Canary tomatoes picked in the Region of Murcia were purchased from a local grocery store. Fruits free from defects and with a similar visual appearance were washed; cut into small pieces, squeezed, milled and filtered using a steel sieve.

### 2.2 Microwave Treatment

Tomato juice (200 mL) were filled into a beaker glass and covered with plastic storage bag. After that beakers were placed in a conventional discontinuous commercial MW oven (SANYO Electric Industrial Co., LTD., UK., 2450 MHz) or in an innovative continuous industrial MW oven (SAIREM IBERICA S.L., SI-MAQ0101, Barcelona, Spain). Conventional MW ovens have a power rating from 600 to 900 W, while continuous MW ovens can be up to 15 KW. In addition this last MW oven includes a computer interface and a fiber optic slip ring for online temperature measurement. Subsequently the samples were treated with different powers and times combinations as reported in Table 1. These combinations were selected after some preliminary experiments.

Once heating all samples were frozen at -80°C until further analysis.

### 2.3 Determination of Total Antioxidant Capacity

The Total Antioxidant Capacity (TAC) was determined by using the ferric reducing ability of plasma (FRAP) method [10]. This assay depends upon the reduction at low pH of ferric tripyridyltriazine complex to the ferrous tripyridyltriazine by a reductant (antioxidant). The reagents used for the FRAP assay were: a)

Acetate buffer 300 mM pH 3.6: Weigh 3.1g sodium acetate trihydrate and add 16 ml of glacial acetic acid and make the volume to 1000 mL with MilliQ water. b) 2, 4, 6-tripyridyl-triazine: 0.1562 g in 0.166mL HCl. c) FeCl<sub>3</sub>. 6 H<sub>2</sub>O: 0.5404 g in 100mL MilliQ water. The working FRAP reagent was prepared by mixing a, b and c in the ratio of 10:1:1 just before testing.

Preparation of samples: 2.5 mL MeOH was added to 0.5mL (500 µL) tomato juice (the glasses were covered by foil). The extraction was carried out in an orbital shaker for 1 hour at 200×g in darkness inside a polystyrene box with an ice bed. The samples were filled out in two eppendorf (by a Pasteur pipette) which were placed in a centrifuge for 10 min at 4 °C and 15×rpm.

Determination of TAC: On a cuvette were added 6µL of sample or standard solution and 198 µL of reagent (with at least 3 cells for blank (6µL MeOH and 198 µL of reagent)). This cuvette was kept for 30-40 min at room temperature in the dark to react. After that the absorbance was read in a spectrophotometer (Tecan Infinite M200, Männedorf, Switzerland) at 593 nm. All of these stages were carried out in the ice and dark.

The analysis were carried out before (control) and after each MW treatment. All analyses were made by triplicate and results were expressed as mg ascorbic acid equivalent (AAE) 100 mL<sup>-1</sup> of tomato juice.

### 2.4 Statistical Analysis

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

## 3. Results and Discussion

### 3.1 Antioxidant Capacity

As expected, the TAC of the tomato juice was influenced by the time and power parameters in both MW ovens. According to results displayed in Table 1, in general, the TAC significantly decreased by increasing the power and time of thermal treatment in both MW ovens. In the conventional MW oven the initial TAC in control samples was 56.11 mg AAE 100 mL<sup>-1</sup>. The maximum decrease (until 78.56 %) was found in the highest power and time (900 W and 150 s) treatment. On the other hand, in the continuous industrial MW oven the control samples of tomato juice were found to have a

TAC of 53.18 mg AAE 100 mL<sup>-1</sup>. This initial TAC level reached the highest decrease (until 56.71 %) under the 1050 W and 150 s treatment (Table 1). The current results agree with those of Barrett et al. [11] who reported that antioxidant components like AA reduced in microwaved tomato juice. Also Zhang and Hamazu [4] and Martínez-Hernández et al. [3] reported that antioxidant activity in broccoli were heavily lost during a conventional MW cooking process.

A long duration of treatment at low power reduced the TAC as a short duration treatment using high power. However, a moderate high power dose (900 W) combined with shorter duration (120 or 150 s) kept better the antioxidant capacity than low power MW dose (750 W) combined with high treatment duration (360 or 420 s). At similar doses (750 W during 120 s or 900 W during 120 and 150 s) the industrial MW provided a slightly lower antioxidant capacity than conventional MW (Table 1).

**Table 1.** Effect of different microwave treatments on the total antioxidant capacity (mg AAE 100 mL<sup>-1</sup>) and of tomato juice.

Dose	Conventional MW	Continuous MW
0 (control)	56.11 ± 0.42 a (100%)	53.18 ± 0.12 a (100%)
750 w - 60 s	54.51 ± 0.56 a (97.15%)	-
750 w - 120 s	52.24 ± 0.41 b (93.10%)	-
750 w - 210 s	50.45 ± 1.06 bc (89.91%)	46.09 ± 0.18 b (86.67%)
750 w - 300 s	-	41.02 ± 0.31 d (77.13%)
750 w - 360 s	-	38.03 ± 0.09 g (71.51%)
750 w - 420 s	-	35.06 ± 0.19 h (65.93%)
900 w - 60 s	49.50 ± 1.09 c (88.22%)	-
900 w - 120 s	45.48 ± 0.75 d (81.06%)	41.90 ± 0.32 c (78.79%)
900 w - 150 s	44.08 ± 0.25 d (78.56%)	40.13 ± 0.15 e (75.46%)
900 w - 180 s	-	38.97 ± 0.08 f (73.28%)
1050 w - 120 s	-	32.11 ± 0.19 i (60.38%)
1050 w - 150 s	-	30.16 ± 0.25 j (56.71%)

\* Data are averages of three replicates ± SE. Values in brackets are the retention percentage of TAC respect to the control. Different letters

in the same column indicate significant differences among mean values (p<0.05).

#### 4. Conclusion

MW heating technology reduced the initial TAC in tomato juice. However, its application in a continuous way with the equipment used in the current work was not efficacy enough when compared to the conventional discontinuous system.

#### 5. Acknowledgements

Thanks are due to Instituto de Biotecnología Vegetal (IBV-UPCT) for providing some of the equipments. This work was financially supported by the Postharvest and Refrigeration Group of the Universidad Politécnica de Cartagena.

#### 6. References

- [1] Tapiero H., Townsend D.M., Tew K.D. 2004. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine Pharmacotherapy* 58: 100-110.
- [2] Young A.J., Lowe G.M. 2001. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 385 (1): 20 – 27.
- [3] Martínez-Hernández G.B., Artés-Hernández F., Gómez P., Artés F. 2013. Induced changes in bioactive compounds of kailan-hybrid broccoli after innovative processing and storage. *J. Funct. Foods*. 5: 133–143.
- [4] Zhang D., Hamazu Y. 2004. Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. *Food Chem.* 88: 503-509.
- [5] Zhang M., Tang J., Mujumdar, A.S., Wang, S. 2006. Trends in microwave-related drying of fruits and vegetables. *Trends Food Sci. Technol.* 17: 524-534.
- [6] Sukhwant M. K., Harvinder K., Tejinder G. 1992. Effect of cooking on fibre content of vegetables. *J. Food Sci. Technol.* 29: 185–186.
- [7] 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): 531–53.

[8] Decareau R.V. 1992. History of the microwave oven. In: Microwave foods: new product development. Trumbull: Food Nutrition Press Inc. 1-46.

[9] Picouet P.A., Landl A., Abadias M., Castellari M., Viñas I. 2009. Minimal processing of a Granny Smith apple purée by microwave heating. *Innov. Food Sci. Emerging Technol.* 10: 545-550.

[10] Benzi I.F.F., Strain J.J. 1966. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239: 70-76.

[11] Barrett D.M., Weakley C., Diaz J.V., Watnik M. 2007. Qualitative and Nutritional Differences in Processing Tomatoes Grown under Commercial Organic and Conventional Production Systems. *J. Food Sci.* 72 (9): 441-51.

## Mapeo varietal de fitoprostanos en almendras: Identificación y cuantificación

A.M. Carrasco del Amor<sup>(1,2)</sup>, J. Collado-González<sup>(3)</sup>, A. Gil-Izquierdo<sup>(3)</sup>, E. Aguayo<sup>(1,2)</sup>

<sup>(1)</sup> Grupo de Postrecolección y Refrigeración, Dpto. Ingeniería de Alimentos, ETSIA-UPCT. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena, España. anacarrascodelamor@hotmail.com

<sup>(2)</sup> Unidad Calidad Alimentaria y Salud, Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). Campus Muralla del Mar. 30202 Cartagena, España.

<sup>(3)</sup> Dpto. de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Campus Universitario de Espinardo, 25. Apto. 164. 30100 Espinardo (Murcia).

### RESUMEN

Recientemente, algunos investigadores han estudiado la relación existente entre el estrés oxidativo y el contenido de determinados compuestos presentes en las plantas denominados fitoprostanos. Las almendras tienen un contenido elevado de ácidos grasos poliinsaturados siendo el mayoritario el ácido  $\alpha$ -linolénico. En 1998, se descubrió que los fitoprostanos se generan a partir del ácido  $\alpha$ -linolénico en una vía no enzimática, iniciada por una mayor formación de radicales libres. En este trabajo se propone la identificación y la cuantificación de fitoprostanos presentes en almendras averiguando si la variedad influye en el contenido de los mismos. Como resultado se obtuvo que en las cinco variedades de almendra estudiadas, el fitoprostano 9-F1t-fitoprostano fue el más abundante aunque también se obtuvieron otros fitoprostanos en menor concentración tipo 9-epi-9E1t-fitoprostano, 9-E1t-fitoprostano, 16-B1-fitoprostano y 9-L1-fitoprostano. Además, la concentración de fitoprostanos se vio afectada por la variedad siendo "Ramillete" la que presentó niveles más elevados.

**Palabras clave:** ácido  $\alpha$ -linolénico; ROS; espectrometría de masas; UHPLC

### 1. Introducción

A principios de 1990, una serie de compuestos similares a las prostaglandinas, fueron identificados por ser producidos en los mamíferos desde el ácido araquidónico, independientemente de la vía de la ciclooxigenasa [1], estos compuestos fueron denominados isoprostanos. Las plantas superiores no poseen ácido araquidónico (C20:4) por lo que no sintetizan isoprostanos ni prostaglandinas. De forma similar al origen de los isoprostanos en los mamíferos, se identificó un nuevo compuesto producido en plantas superiores, denominado fitoprostano (PPs). PPs son generados desde el ácido  $\alpha$ -linolénico en una vía no enzimática, iniciada por una mayor formación de radicales libres [2]. Estos compuestos son considerados marcadores fiables de estrés oxidativo en plantas superiores [3]. El campo de los PPs fue descubierto en el año 2000, cuando estos metabolitos fueron detectados por la oxidación no enzimática del ácido  $\alpha$ -linolénico [4]. En la actualidad hay como una veintena de publicaciones sobre este tema, lo

que demuestra que en este campo todavía queda mucho por investigar.

El almendro es una especie típica del paisaje Mediterráneo, España es el segundo mayor productor de almendra, después de Estados Unidos, además de ser el mayor consumidor, ya que las almendras forman parte de nuestra dieta mediterránea.

El consumo de almendras y nueces ha sido asociado con la disminución de enfermedades cardíacas coronarias y con el síndrome metabólico [5] esto puede estar relacionado por su perfil favorable de ácidos grasos insaturados (ácido linoléico y ácido linolénico) y, por tanto, relación con los PPs.

Las primeras investigaciones confirman que la genética, el tiempo de cosecha, el origen, condiciones ambientales, la composición del suelo, la madurez del fruto afectan a la composición de las almendras y de las nueces [6,7-8]. Por todo lo expuesto, el presente trabajo tiene como objetivo identificar y cuantificar la concentración de PPs presentes

en almendras y saber si éstos varían según la variedad.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Productos químicos y reactivos

El hexano fue obtenido de Proquilab (Cartagena, Murcia, España), Bis-Tris (bis 2-hydroxyethyl) amino-tris (hydroxymethylmethane) fue adquirido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO EEUU) como el resto de los disolventes necesarios para el cromatógrafo de líquidos-masas (LC-MS) como metanol, acetronitrilo y 2,6-di-butil hidroxi anisol (BHA).

Los cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) que se usaron fueron cartuchos Strata (Strata X-AW, 100 mg/3mL) adquiridos en Phenomenex (Torrance, CA, EEUU).

### 2.2 Preparación de las muestras

Las muestras fueron molidas en un molinillo de café hasta convertirlas en un fino polvo, 2-3 g de peso fresco, fue suspendido en una disolución que contenía 10 mL de BHA (10:01 v/v), se agitó durante 5 minutos y después se centrifugó (2000 *xg* durante 10 minutos), luego se extrajo el sobrenadante y se pasó por un filtro tipo Sep Pack.

### 2.3 Extracción de las muestras.

Los PPs presentes en las almendras fueron aislados mediante una extracción líquido-líquido (LLE) seguida de una extracción en fase sólida (SPE). La extracción LLE se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo: 1 mL de la muestra filtrada se disolvió en 1 mL de n-Hexano [9]. La solución fue diluida en 2 mL de metanol, se agitó y se volvió a diluir en 2 mL de BIS-TRIS buffer (0,02 M, HCl, pH=7). Seguidamente, se separó mediante los cartuchos de fase sólida, según el proceso previamente descrito por Medina y colaboradores [10]. Previamente, los cartuchos se acondicionaron con 2 mL de hexano, 2 mL de metanol y 2 mL de agua MilliQ. Cada muestra se filtró en un ratio de alrededor de una gota cada 2 segundos, después de esto, los cartuchos fueron lavados con 2 mL de hexano, 2 mL de agua MilliQ, 2 mL de una solución que contenía agua MilliQ y metanol (3/1) y 2 mL de acetronitrilo para

eliminar los compuestos indeseados. El compuesto deseado fue eluctado con 1 mL de metanol y fue secado usando un evaporador SpeedVac (Savant SPD121P, Thermo Scientific, MA, EEUU). El extracto seco fue reconstituido con 200  $\mu$ L de A/B disolventes (90:10, v/v), conteniendo el disolvente A una mezcla de agua MilliQ/0.01% de ácido acético y una solución de metanol/0.01% de ácido acético fue usado como disolvente B. A continuación, las muestras fueron sonicadas durante 10 minutos y centrifugadas (1000 *xg* durante 10 minutos) antes de ser filtradas por un filtro 0.45  $\mu$ m (Millipore, MA, EEUU).

Finalmente, 20  $\mu$ L de esta muestra fue inyectada y analizada por UHPLC-QqQ-MS/MS (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

## 3. Resultados y Discusión

Se identificaron 5 PPs cuya concentración dependía del tipo de variedad analizada. El fitoprostano 9-F1t-fitoprostano fue el más abundante (Tabla 1) aunque también se obtuvieron otros fitoprostanos en menor concentración como 9-*epi*-9E1t-fitoprostano, 9-E1t-fitoprostano, 16-B1-fitoprostano y 9-L1-fitoprostano. Los PPs F1 se encuentran normalmente en los lípidos de la membrana como se ha demostrado por los isoprostanos F2 en los mamíferos [11]. Como se ha citado anteriormente, estos compuestos son marcadores fiables de estrés oxidativo en plantas superiores y el tipo de variedad es un factor que influye en la cuantificación de PPs (Tabla 1). La variedad “Ramillete” presentó una mayor concentración de PPs F1 siendo estadísticamente similar a las variedades “Marcona” y “Ferrañes”.

## 4. Conclusiones

En las variedades estudiadas de almendra se identificaron 5 tipos de PPs siendo el F1, el de mayor concentración. Existió una influencia varietal siendo “Ramillete” la que presentó el mayor contenido en F1.

## 5. Agradecimientos

Se agradece al Instituto de Biotecnología Vegetal de la UPCT y al CEBAS-CSIC la utilización de los equipos de análisis.

## 6. Referencias bibliográficas

- [1] Morrow J.D., Minton T.A., Roberts, L.J. 1992. Prostaglandins 44: 155-163.
- [2] Imbusch R., Mueller M. J. 2000. Analysis of Oxidative Stress and Wound-Inducible Dinor Isoprostanes F 1 (Phytoprostanes F 1) in Plants. *Plant Physiol.* 124: 1293–1303.
- [3] Thoma I., Loeffler C., Sinha A. K., Gupta M., Krischke M., Steffan B., Mueller M.J. 2003. Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *Plant J.* 34: 363–37.
- [4] Imbusch R., Mueller M. J. 2000. Formation of isoprostane F2-like compounds (phytoprostanes F1) from  $\alpha$ -linolenic acid in plants. *Free Radical Biology and Medicine*, 720-726. [5] Kris-Etherton, P.M., Zhao, G., Binkoski, A.E., Coval, S. M., Etherton, T.D. 2001. The effects of nuts on coronary heart disease risk. *Nutrition Reviews* 59: 103–111.
- [6] Lavedrine F., Ravel A., Villet A., Ducros V., Alary J. 2000. Mineral composition of two walnut cultivars originating in France and California. *Food Chem.* 68: 347–351.
- [7] Parcerisa J., Rafecas M., Castellote A.I., Codony R., Farrán A., Garcia J., (1995). Influence of variety and geographical origin on the lipid fraction of hazelnuts (*Corylus avellana* L.) from Spain: (III) oil stability, tocopherol content and some mineral contents (Mn, Fe, Cu). *Food Chem.* 53: 71–74.
- [8] Wakeling L. T., Mason R. L., D. Arcy R. B., Caffin N. A. (2001). Composition of pecan cultivars Wichita and Werstern Schley [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] grown in Australia *J. Agr. Food Chem.* 49: 1277–1281
- [9] Del Carlo M., Ritelli E., Procida, G., Murmura, F., Cichelli, A. 2006. Characterization of extra virgin olive oils obtained from different cultivars, *Pomologia Croatica* 12: 29–41.
- [10] Medina S., Dominguez-Perles R., Gil J.I., Ferreres F., García Viguera C., Martínez-Sanz J. M., Gil-Izquierdo A. 2012. A ultra-pressure liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry method for the analysis of 13 eicosanoids in human urine and quantitative 24 hour values in healthy volunteers in a controlled constant diet. *Rapid Commun. Mass Sp.* 26: 1249-1257.
- [11] Morrow J.D., Awad J.A., Boss H.J., Blair I.A., Roberts L.J. 1992. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed *in situ* in phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 10721–10725.

**Tabla 1.** Fitoprostano principal (9-F1t-Fitoprostano) en diversas variedades de almendras

Variedad	9-F1t PhytoP (ng/100g de peso fresco)
Ramillete	7796,39 <sup>a</sup>
Blanqueta	7016,28 <sup>ab</sup>
Guara	6682,42 <sup>abc</sup>
Marcona	5338,31 <sup>bcd</sup>
Ferrañes	4464,62 <sup>cd</sup>

Distintas letras indican diferencias significativas dentro de cada variedad según la prueba de Fisher ( $p < 0.05$ ).

## Determination of genes involved in heat resistance response of *Cronobacter sakazakii*

J.P. Huertas<sup>(1)</sup>, M. Ros<sup>(1)</sup>, M. Esteban,<sup>(1)</sup> A. Palop<sup>(1)</sup>, C. Hill<sup>(2)(3)</sup>,  
A. Álvarez<sup>(2)(3)</sup>

<sup>(1)</sup> Dpto. Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Universidad Politécnica de Cartagena, España. jphb@alu.upct.es

<sup>(2)</sup> Department of Microbiology, University College Cork, Western Road, Cork, Ireland.

<sup>(3)</sup> Food for Health Ireland, University College Cork, Western Road, Cork, Ireland.

### RESUMEN

*Cronobacter sakazakii* is considered an emerging opportunistic pathogen causing meningitis, septicaemia and enterocolitis in neonates, related to the use of contaminated Powdered Infant Formula (PIF). *C. sakazakii* has an unusual surviving ability under dry conditions and has been suggested to be one of the most thermotolerant members of the *Enterobacteriaceae*. It is necessary to understand the molecular mechanisms underlying the thermal resistance of *C. sakazakii* and may ultimately be useful in the development of control strategies in PIF factories. In the current study, a transposon mutagenesis approach was used to identify the genes involved in heat resistance. A total of 23 mutants were found corresponding to 12 different defective genes. Heat resistance of selected mutants were determined with the use of the thermoresistometer Mastia. Only 2 mutants had a greater sensitivity to heat compared with the heat resistance of the wild type. Genes identified to be involved in the cellular response to thermal treatments were Ribosome maturation protein RimP and Outer membrane Porin L (OmpL). The results suggest that the novo protein synthesis, and the use of cysteine for the formation of disulfide bonds for stabilization of proteins against denaturation during thermal treatments are key processes in the resistance against heat stress.

**Palabras clave:** *C. sakazakii*, Heat resistance; Transposon mutagenesis; Heat response; Weibull distribution

### 1. Introduction

*Cronobacter sakazakii* is a gram-negative rod belonging to the family *Enterobacteriaceae*. It is also considered an emerging opportunistic pathogen causing meningitis, septicaemia and enterocolitis in neonates, related to the use of contaminated Powdered Infant Formula (PIF). Preterm, low-birth-weight or immune-compromised infants exposed to *C. sakazakii* are at particular risk. Mortality rates of 10%-80% have been described and survivors often suffer from neurological sequel [1][2]. *C. sakazakii* has an unusual surviving ability under dry conditions, but the thermal tolerance of this microorganism strains may differ [2]. Some authors suggested that *C. sakazakii* is one of the most thermotolerant members of the *Enterobacteriaceae*, having a D-value of 4.2 min at 58°C. On the other hand, recent studies revealed that some *C. sakazakii* strains do not show such thermotolerance [3]. Indeed, D-values at 58°C have been reported to range from 0.27 to 9.87 min [3][4]. Some studies show that *C. sakazakii* can survive to thermal

stress (either during manufacture, or when the PIF is reconstituted) [4][5][6]. At home, manufacturers recommend to prepare the formula just before each feeding using boiled water. The FAO-WHO (2004) recommended the use of hot water (70°-90°C) during the reconstitution of powdered, due the heat resistance of this microorganism.

A greater understanding of the molecular mechanisms underlying the thermal resistance of *C. sakazakii* is required and may ultimately be useful in the development of control strategies in PIF factories. In the current study, a transposon mutagenesis approach was employed to identify the genes involved in heat resistance.

### 2. Materials & Methods

2.1 Bacterial strain and culture conditions: *Cronobacter sakazakii* DPC6529 strain used in this study was obtained from the University College of Cork culture collection. The culture was routinely grown in Luria-Bertani (LB) medium.

**2.2 Screening of a *C. sakazakii* DPC6529 transposon mutagenesis library:** A transposon mutagenesis library constructed in a previous study [7] by using the EZ-Tn5<KAN 2>Tnp transposome kit (Epicentre, Madison, USA) was tested.

**Selection:** Thermal resistance determinations were done at 60°C, in an eppendorff heating-block. Pre-selected mutants, in a previous sep, were those showing no growth or slow growth in the pre-selection. Pre-selected mutants were grown overnight in LB broth + kanamycin and incubated overnight (~16 h) at 37°C. Sterile eppendorffs with 990 mL of ¼ strength Ringer's solution were pre-heated at 60°C, were inoculated with 10 µL of the overnight to reach a concentration of approx. 10<sup>6</sup> cells/mL. Samples were collected at preset times. Samples were properly diluted and plated in LB agar + kanamycin.

The transposon insertion sites were identified by modified single-primer PCR, as done by Alvarez-Ordoñez et al., 2014. The location of the transposon insertion was revealed with the help of BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analysis ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)).

**2.3 Heat resistance:** Heat resistance determinations were carried out in a thermoresistometer Mastia [8]. Three separate experiments per condition were performed. Viable counts were based on duplicate counts, from appropriate dilutions in L.B agar for *C. sakazakii* DPC6529 and LB agar + kanamycin for *C. sakazakii* DPC6529 transposon mutants. Plates were incubated for 24 h at 37°C for *C. sakazakii* DPC6529 and for 48 h at 37°C for transposon mutants.

**2.4 Data analysis:** Survival curves were obtained by plotting the logarithm of CFU/mL vs the treatment time.

Survival curves showed an upward concavity (presence of a tail). The cumulative form of the Weibull distribution function, as proposed by Mafart et al (2002), was used (Eq. 1):

$$\log N_t = \log N_0 - (t/\delta)^p \quad (1)$$

Where  $N_t$  is the final population,  $N_0$  the initial population,  $\delta$  represents the time for the first decimal reduction (min), and  $p$  is the shape parameter. A single  $p$  value for all survival curves corresponding to each strain was used as proposed by Esteban et al. (2013). Calculations were estimated with the GlnaFIT application (version 1.6) for Microsoft Excel [10].

### 3. Results and Discussion

The mutant library used has about 2400 mutants. After the pre-selection 140 mutants showed some sensitiveness to heat treatment. From these 140 mutants, the defective gene can be involved in heat resistance or in growth or other metabolic functions. Therefore a selection step was done, in which the heat resistance of the 140 mutants was compared to the heat resistance of the wild type strain by using a simple thermal resistance determination method. The selection enabled to shift out the mutants in which the transposon was inserted in genes involved in heat resistance, from those that was not. Heat resistance determinations were primarily carried out in an eppendorff heating-block due it quickness and easiness to analyze a large amount of samples in a short time. The use of the thermoresistometer mastia to analyze the selected mutants was due to the higher accuracy of the thermoresistometer on the heat resistance determination [11]

After theselection step, 28 mutants were found to show a significant decrease in the heat resistance compared to the wild type. From the 28 sensitive mutants 5 were not able to be sequenced. Transposon insertion sites were mapped for the rest (Table 1). Using standard homology searches, the insertion sites were mapped in the genome of *C. sakazakii* ES15, and functions were assigned to the defective genes.

In the thermoresistometer the thermal resistance comparisons were done at a temperature of 58°C in LB broth. Survival curves from the tested mutants showed tailing phenomena ( $p < 1$ ), except from the mutant 7 that showed a slight shoulder ( $p > 1$ ) (Table 2). Mutants showed slight differences in thermal resistance when they were compared to the wild type, except for mutants 7 and 10, which showed a greater sensitivity to heat. Table 2 shows the heat resistance values ( $\delta$  value), the determination coefficients ( $r^2$ ), and the time needed for a 5 log cycle reduction, for the wild type and the mutants. It is necessary 2.25 min at 58°C to reduce 5 log cycles the initial population of *C. sakazakii* DPC6529 (wild type), while only 1.70 and 1.86 min are necessary to achieve the same level of reduction in the population of mutants 7 and 10, respectively.

Genes identified for Mutant 7 and 10 were Ribosome maturation protein RimP and Outer membrane Porin L (OmpL), respectively (Table 1). RimP has an important function in ribosome



assembly at high temperature. Nord, Bylund & Lövgren (2009), reported that in *Escherichia coli* the RimP protein facilitates the maturation of the 30S subunits so that translational competent. OMPs include integral membrane proteins as well as lipoproteins that are anchored to the outer membrane via N-terminally attached lipid. Nutrients too large to transverse general porin channels enter through specific porins [13][14][15]. Outer membrane porin L (OmpL) protein, allows an efficient diffusion of low-molecular-weight solutes such as small sugars and tetraglycine [16]. Datigalongue, Nikaido & Raina (2000), showed that OmpL allowed rapid permeation of cysteine (Cys) and reduced glutathione at rates expected from the sizes of these compounds. Cysteine is an essential amino acid that performs vital functions in the catalytic activity and structure of many proteins. The formation of disulfide bonds between cysteine are needed for proper folding and stability of some proteins, particularly those found in extracytoplasmic compartments [17]. Considering the above together with the results of this study, it can be suggested that *C. sakazakii* use disulphide bonds to stabilize proteins against denaturation during thermal treatments. In the other hand the deficiency of the RimP protein produces a dearth in mature 30S subunits and an absence of ribosome assembly at high temperatures, affecting predicted roles in translation and protein synthesis, leading the cell unable to recover from the damage caused by thermal treatments.

#### 4. Conclusion

Our study sheds light on some of the molecular mechanisms involved in the cellular response of *C. sakazakii* to thermal treatments. Our findings suggest that the novo protein synthesis, and the use of cysteine for the formation of disulfide bonds for stabilization of proteins against denaturation during thermal treatments are key processes in the resistance against heat stress. Further studies are therefore needed in order to better characterize the response of *C. sakazakii* to thermal treatments

#### 5. Acknowledgments

The financial support of this research was provided by the Ministry of Science and Technology of the Spanish Government and European Regional Development Fund (ERDF) through Project AGL- 2010-19775. J.P Huertas is grateful to the Spanish Ministry of Science

and Innovation for his fellowship (BES-2011-046580). We acknowledge the funding received by Food for Health, Ireland under the grant number CC20080001 by Enterprise Ireland.

#### 6. References

- [1] Fiore, A., Casale, M., Aureli. 2008. *Enterobacter sakazakii*: epidemiology, clinical presentation, prevention and control. Ann Ist Super Sanità. 44, 3:275-280.
- [2] Dumen, E. 2010. *Cronobacter sakazakii* (*Enterobacter sakazakii*): Only an infant problem?. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 16:S171-S178.
- [3] 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.
- [4] Osaili, T.M., Shaker, R.R., Al-Haddaq, M.S., Holley, R.A. 2009. Heat resistance of *Cronobacter* species (*Enterobacter sakazakii*) in milk and special feeding formula. J. Appl. Microbiol. 107: 928-935.
- [5] Asakura, H., Morita-Ishihara, T., Yamamoto, S., Igimi, S. 2007. Genetic characterization of thermal tolerance<sup>4</sup> in *Enterobacter sakazakii*. Microbiol. Immunol. 51(7):671-677.
- [6] Food and Agriculture Organization-World Health Organization (FAO-WHO). 2004. *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant Formula. Meeting report, MRA series 6. World Health Organization, Geneva, Switzerland. <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra6/en/>.
- [7] Álvarez-Ordoñez, A., Begley, M., Clifford, T., Deasy, T., Collins, B., Hill, C. 2014. Transposon mutagenesis reveals genes involved in osmotic stress and drying in *Cronobacter sakazakii*. Food. Res. Int. 55:45-54.
- [8] Conesa, R., Andreu, S., Fernández, P.S., Esnoz, A., Palop, A. 2013. Nonisothermal heat resistance determinations with the thermoresistometer Mastia. J. Appl. Microbiol., 107:506-513.
- [9] 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.
- [10] Esteban, M.D., Huertas, J.P., Fernández, P.S., Palop, A. 2013. Effect of the medium characteristics and the heating and cooling rates on the nonisothermal heat resistance of

*Bacillus sporothermodurans* IC4 Spores. Food Microbiol. 34:158-163.

[11] Palop, A., Sala, F.J, Condón, S. 2012. Thermoresistometers for assessing microbial heat resistance. In V.P. Valdramidis & J.F.M. Van Impe (Eds). (pp. 39-66). Nova Science Publishers, Incorporated.

[12] Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P, Van Impe, J.F. 2005. GinaFIT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. Int. J. Food. Microbiol. 102:95-105.

[13] Nord, S., Bylund, G.O., Lövgren, J.M., Wikström, P.M. 2009. The RimP protein is important for maturation of the 30S ribosomal subunit. J. Mol. Biol. 386:742-753.

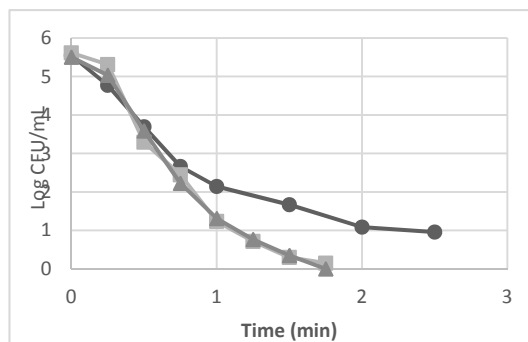
[14] Lin, J., Huang, S., Zhang, Q. 2002. Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. Microbes. Infect. 4:352-331.

[15] Klebba, P.E., Newton, S.M.C. 1998. Mechanism of solute transport through outer membrane porins: burning down the house. Curr. Opin. Microbiol. 1:238-248.

[16] Dartigalongue, C., Nikaido, H., Raina, S. 2000. Protein in the periplasm in the absence of the primary oxidant DsbA: modulation of redox potential in periplasmic space via OmpL porin. The EMBO J. 19: 5980-5988.

[17] Lithgow, J.K., Hayhurst, E.M., Cohen, G., Aharonowitz, Y., Foster, J.F. 2004. Role of a cysteine synthase in Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. 186:1579-1590.

**Tables and Figures**



**Figure 1.** Thermal resistance of *C. Sakazakii* DPC6529 (●), mutant 7 (■) and mutant 10 (▲) at 58°C in LB broth

Mutant	Gene	Locus Tag
1	Putative pili assembly Chaperone (4)	ES15_0052
2	Thiosulfate sulfur transferase GlpE (4)	ES15_0248
3	Hypothetical Protein (Membrane Protein; Homologue to a type VI Secretion System-Associated protein) (4)	ESA_03930
4	Li popolysaccharide biosynthesis protein WZZE (1)	ES15_3698
5	Transposon protein TonB (1)	CSSP291_07485
6	RNA-23s ribosomal RNA (1)	ES15_4326
7	Ribosome maturation protein RimP (1)	ES15_3516
8	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit ClpP (3)	ES15_2946
9	(Dimethylallyl) Adenosine Trna methyltransferase (1)	ES15_2748
10	Outer membrane Porin L OMPL (1)	ES15_0029
11	Hypothetical (Family Methyltransferase; AdomeL_Mtase - Domain) (Tellurite Resistance Protein) (1)	ES15_3416
12	Hypothetical Protein (1)	

**Table 2.** Heat resistance values for *C. sakazakii* DPC6529 and sensitive mutants obtained at 58 °C in LB broth, as derived from the Weibull model.

	p	δ	R2	5D±S.D
Wild Type	0.788	0.292	0.921	2.25 ± 0.126
Mutant 7	0.943	0.293	0.943	1.695 ± 0.078
Mutant 10	1.182	0.471	0.966	1.863 ± 0.023

**Table 2.** Heat resistance values for *C. sakazakii* DPC6529 and sensitive mutants obtained at 58 °C in LB broth, as derived from the Weibull model.

## Uso de plantas comestibles silvestres como ingredientes funcionales en la dieta moderna

A. Romojaro, M. A. Botella, C. Obón, M. T. Pretel

Universidad Miguel Hernández, Ctra Beniel-Orihuela, Km 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, España.  
anaromojaro@ono.com

### RESUMEN

Se han evaluado trece especies de plantas silvestres comestibles pertenecientes a once familias botánicas consumidas en la dieta mediterránea tradicional. *Sanguisorba minor*, *Quercus ballota* y *Sedum sediforme* mostraron la mayor actividad antioxidante total hidrofílica (H-AAT), así como el mayor contenido en fenoles totales. El análisis sensorial indicó que los frutos de *Q. ballota* podrían considerarse muy dulces y que las plantas de *Crithmum maritimum* y *Oxalis pes-caprae* son muy ácidas. Además, los catadores destacaron el sabor salado de *C. maritimum*, *Mesembryanthemum nodiflorum* y *Mesembryanthemum cristalinum*, el sabor picante de *A. ampeloprasum*, y el aroma de *F. vulgare*. Nuestros resultados indican que debido a sus propiedades funcionales y sensoriales, podrían utilizarse como nuevos ingredientes para aumentar la variedad en la dieta moderna y en la alta cocina creativa.

**Palabras clave:** Actividad antioxidante; dieta moderna; propiedades nutricionales; especies vegetales infrautilizadas.

### 1. Introducción

La diversificación de la producción y de los hábitos de consumo con el fin de incluir una gama más amplia de especies vegetales, podría contribuir de manera significativa a mejorar la salud, la nutrición, los medios de subsistencia y la sostenibilidad ecológica. Estudios recientes han resaltado el interés de las plantas comestibles silvestres como fuente de nutraceuticos [1] y diferentes estudios epidemiológicos sugieren que una ingesta elevada de alimentos ricos en antioxidantes naturales reduce el riesgo de padecer algunos cánceres así como enfermedades cardíacas y degenerativas.

Actualmente, los consumidores valoran la sustitución de aditivos sintéticos por aditivos naturales y, además, buscan introducir nuevos productos en sus comidas. Necesitan nuevos colores, sabores, texturas e ingredientes [2] y, por esa razón, muchos cocineros de restaurantes de alta gama están interesados en descubrir y emplear plantas que hayan sido utilizadas tradicionalmente [3].

Tanto en España como en otros países europeos, las plantas comestibles silvestres han sido consumidas de forma habitual y han formado parte de muchos platos tradicionales [4,5]. La mayoría de estas especies vegetales son buenas candidatas a ingredientes funcionales y podrían introducirse en la dieta moderna [6]. Sin embargo, para que estas plantas silvestres se conviertan en

una alternativa para la industria alimentaria, es necesario un mayor conocimiento sobre sus propiedades físico-químicas, antioxidantes y nutricionales [7]. La industria gastronómica podría utilizar estos estudios para conocer su potencial agro-industrial y promover su uso como aditivos o ingredientes naturales.

Existen pocos estudios publicados sobre propiedades nutricionales y funcionales de muchas plantas silvestres. Dicha información podría ser valiosa, no solo para determinar los contenidos en nutrientes que pueden complementar el valor nutricional de la dieta normal, sino también para los expertos en medio ambiente implicados en el diseño de programas de conservación orientados a proteger y propagar plantas silvestres con valor nutricional [3-5].

El objetivo de este artículo es documentar las propiedades antioxidantes y las características sensoriales de diferentes especies de plantas silvestres que han sido utilizadas de forma tradicional en zonas del Mediterráneo o por cocineros de cocina contemporánea.

### 2. Materiales y Métodos

#### 2.1 Material vegetal

Se eligieron diferentes partes de 13 plantas

comestibles (Tabla 1) consumidas en la dieta mediterránea según estudios etnobotánicos previos [3-5], o utilizadas actualmente en restaurantes europeos. Las muestras se liofilizaron tras su recolección. Los resultados experimentales se expresaron como media  $\pm$  error estándar (EE) de tres réplicas.

## 2.2 Actividad antioxidante y compuestos fenólicos

La actividad antioxidante total hidrofílica (H-TAA) se cuantificó según [8]. Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de Trolox  $100\text{ g}^{-1}$ . Los compuestos fenólicos totales se cuantificaron según el método descrito por [9] utilizando el reactivo Folin-Ciocalteu y los resultados se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálico  $100\text{ g}^{-1}$ .

## 2.3. Atributos sensoriales

Diez catadores entrenados juzgaron tres atributos sensoriales de forma cuantitativa: dulzor, acidez y aroma. Para valorar cada atributo se utilizó una escala de 0 (valor mínimo) a 10 (valor máximo). Los catadores también hicieron una evaluación cuantitativa total de cada especie y señalaron cualitativamente las propiedades más destacadas.

## 2.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA). Se utilizaron los valores de diferencia mínima significativa (LSD,  $p \leq 0,05$ ) para comparar las medias.

# 3. Resultados y Discusión

## 3.1 Actividad antioxidante y compuestos fenólicos

La actividad antioxidante total hidrofílica (H-AAT) más elevada (Figura 1a) se encontró en *Sanguisorba minor*, *Quercus ballota* y *Sedum sediforme*, con  $1.368,91 \pm 47,96$ ,  $1.186,91 \pm 109,31$  y  $588,87 \pm 35,52$  mg equivalentes de Trolox  $100\text{ g}^{-1}$  PF, respectivamente. Estos niveles tan elevados de H-AAT se encuentran en otros frutos o partes de plantas utilizadas para usos medicinales [10], y en otros frutos silvestres, como moras, arándanos o fresas. Esta capacidad antioxidante extremadamente alta se ha atribuido a un alto contenido en fitonutrientes [11]. Otras especies estudiadas, como *Cistus albidus* (pétalos) y *Malva sylvestris* (hojas), también mostraron una alta capacidad antioxidante, con valores de  $132,14 \pm 4,91$  y  $77,92 \pm 5,71$  mg equivalentes de Trolox  $100\text{ g}^{-1}$  PF, respectivamente, aunque su

actividad era alrededor de 20 veces menor que la de *S. minor* y *Q. ballota*. Por tanto, la especie *S. minor* podría considerarse como un posible nuevo ingrediente antioxidante para el mercado de los alimentos funcionales o nutraceuticos. Las demás especies analizadas y los frutos inmaduros de *M. sylvestris* mostraron una capacidad antioxidante unas 50 veces menor que la de *S. minor* y *Q. ballota*. Aunque esta actividad no es muy alta, es similar a la de uvas y naranjas, y mayor que la de otras frutas como tomate, plátano, melocotón o manzana [12].

La planta con los niveles más altos de fenoles totales ( $530,51 \pm 21,12$  mg  $100\text{ g}^{-1}$  PF) fue *S. minor* (Figura 1b), con niveles parecidos a los encontrados en algunos cultivares de *Fragaria vesca*, una fruta que tiene niveles elevados de compuestos fenólicos [13, 14]. De acuerdo con nuestros resultados, también Vanzani et al. [15] encontraron niveles particularmente altos de polifenoles y de capacidad antioxidante en *S. minor*. Las especies *Q. ballota*, *C. albidus* y *S. sediforme* también mostraron altos niveles de compuestos fenólicos,  $326,91 \pm 51,05$ ,  $269,46 \pm 21,15$  y  $191,53 \pm 13,78$  mg  $100\text{ g}^{-1}$  PF, respectivamente. Estos valores son parecidos, e incluso superiores, a los encontrados por Proteggente et al. [12] en frutas de consumo habitual que tienen un alto contenido en polifenoles, como ciruela ( $320$  mg  $100\text{ g}^{-1}$  PF) o frambuesa ( $228$  mg  $100\text{ g}^{-1}$  PF)

## 3.2 Propiedades sensoriales

Desde el punto de vista del consumidor (Tabla 2), las especies *A. ampeloprasum*, *A. acutifolius*, *C. albidus* y *F. vulgare* presentaron un valor medio de dulzor (entre 6 y 8), mientras que los frutos de *Q. ballota* podrían considerarse muy dulces ( $8,5 \pm 0,37$ ). Estas especies podrían utilizarse como ingredientes para endulzar ensaladas u otros platos. Por otra parte, en relación con la acidez, *C. maritimum* y *O. pes-caprae* mostraron los niveles máximos, con  $7 \pm 0,58$  y  $8,75 \pm 0,14$ , respectivamente.

Las plantas más aromáticas fueron *A. ampeloprasum*, *A. acutifolius*, *C. maritimum*, *F. vulgare* y *Q. ballota*, con valores por encima de 8. Además, el panel de catadores resaltó algunas características de las plantas que las hacen adecuadas como ingredientes para mejorar el sabor, el aroma o la textura. Tres especies destacaban por su sabor salado: *C. maritimum*, *M. nodiflorum* y *M. cristalinum*, mientras que *A. ampeloprasum* podría añadir un ligero sabor picante a las comidas, y *O. pes-caprae* y *Q. ballota* podrían contribuir con sabores muy ácidos o

dulces, respectivamente.

Se destacaron los pétalos de *C. albidus* por su color rosa y *F. vulgare* por su aroma, mientras que el resto de especies (*S. sediforme*, *M. sylvestris*, *U. urens*) fueron apreciadas por su aspecto, diferente del de los demás vegetales comerciales. Estas plantas, al igual que *S. minor*, podrían utilizarse en ensaladas. Sin embargo, cuando se evaluó la apreciación global, solo cuatro especies consiguieron una puntuación positiva (entre 6 y 10): *A. ampeloprasum*, *A. acutifolius*, *M. cristalinum* y *Q. ballota*. Pero debe señalarse que estos valores (Tabla 2) son el resultado de las evaluaciones de cada parámetro utilizando material crudo o cocido. Estas plantas podrían ser más apreciadas por el consumidor utilizadas con condimentos o aliñadas en ensaladas.

#### 4. Conclusiones

Considerando tanto la actividad antioxidante total como el contenido fenólico de las plantas analizadas, *S. minor*, *Q. ballota*, *S. sediforme* y *C. albidus* podrían utilizarse como suplementos nutricionales en alimentos funcionales con alta actividad antioxidante y como antioxidantes naturales para sustituir a los sintéticos. *S. minor* y las flores rosas de *C. albidus* podrían proporcionar color y mejorar el aspecto de las ensaladas. Por tanto, el consumo de las especies de plantas estudiadas podría aumentar la variedad de ingredientes en la alta cocina creativa, al tiempo que aportar beneficios para la salud debido a sus altos valores antioxidantes.

#### 6. Referencias bibliográficas

- [1] Leonti M. 2012. The co-evolutionary perspective of the food-medicine continuum and wild gathered and cultivated vegetables. *Gen Res Crop Evol* 59:1295–1302.
- [2] Mlcek J, Rop O. 2011. Fresh edible flowers of ornamental plants – a new source of nutraceutical foods. *Trends Food Sci Technol* 22: 561–569.
- [3] Egea I, Sánchez-Bel P, Romojaro F, Pretel MT. 2010. Six edible wild fruits as potential antioxidant additives or nutritional supplements. *Plant Foods Human Nutr* 65:121–129.
- [4] Luczaj L, Pieroni A, Tardío J, Pardo-de-Santayana M, Soukand R, Svanberg I, Kalle R. 2012. Wild food plant use in 21st century Europe: the disappearance of old traditions and the search for new cuisines involving wild edibles. *Acta Soc Botan Polo* 81: 359–370.
- [5] Rivera D, Obón C, Heinrich M, Inocencio C, Verde A, Fajardo J. 2006. Gathered Mediterranean food plants - ethnobotanical investigations and historical development. In: Heinrich M, Müller WE, Galli C, editors. *Local Mediterranean food plants and nutraceuticals*. Basel, Karger: Forum Nutrition. p 18–74.
- [6] Tardío J, Pardo de Santayana M, Morales R. 2006. Ethnobotanical review of wild edible plants in Spain. *Botan J Linnean Soc* 152:27–71.
- [7] Turner NJ, Luczaj LJ, Migliorini P, Pieroni A, Dreon, AL, Sacchetti, LE, Paoletti MG. 2011. Edible and tended wild plants, traditional ecological knowledge and agroecology. *Crit Rev Plant Sci* 30:198–225.
- [8] Martins D, Barros L, Carvalho AM, Ferreira IC. 2011. Nutritional and in vitro antioxidant properties of edible wild greens in Iberian Peninsula traditional diet. *Food Chem* 125:488–494.
- [9] Serrano M, Guillén F, Martínez-Romero D, Castillo S, Valero D. 2005. Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *J Agric Food Chem* 53:2741–2745.
- [10] Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Meth Enzymol* 299:152–178.
- [11] Surveswaran S, Cai YZ, Corke H, Sun M. 2007. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chem* 102:938–953
- [12] García-Alonso M, De Pascual TS, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC. 2004. Evaluation of the antioxidant properties of fruit. *Food Chem* 84: 13–18.
- [13] Proteggente AR, Pannala AS, Paganga G, Van Buren L, Wagner E, Wiseman S. 2002. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Rad Res* 36:217–233.
- [14] Doumett S, Fibbi D, Cincinelli A, Giordani E, Nin S, Del Bubb, M. 2011. Comparison of nutritional and nutraceutical properties in cultivated fruits of *Fragaria vesca* L. produced in Italy. *Food Research International* 44:1209–1216.
- [15] Vanzani P, Rossetto M, De Marco V, Sacchetti LE, Paoletti MG, Rigo A. 2011. Wild Mediterranean plants as traditional food: a valuable source of antioxidants. *J Food Sci* 76:46–51.

Tablas y Figuras

Tabla 1. Especies de plantas analizadas

Especies	Parte analizada
<i>Allium ampeloprasum</i> L.	Hojas
<i>Asparagus acutifolius</i> L.	Brotes jóvenes
<i>Cistus albidus</i> L.	Pétalos
<i>Crithmum maritimum</i> L.	Hojas
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Hojas, brotes jóvenes
<i>Malva sylvestris</i> L.	Hojas
<i>Malva sylvestris</i> L.	Frutos inmaduros
<i>Mesembryanthemum nodiflorum</i> L.	Hojas
<i>Mesembryanthemum cristalinum</i> L.	Hojas
<i>Oxalis pes-caprae</i> L.	Hojas y pedúnculo de la inflorescencia
<i>Quercus ballota</i> Desf.	Frutos (bellotas)
<i>Sanguisorba minor</i> Scop.	Hojas
<i>Sedum sediforme</i> Pau	Hojas
<i>Urtica urens</i> L.	Hojas y brotes

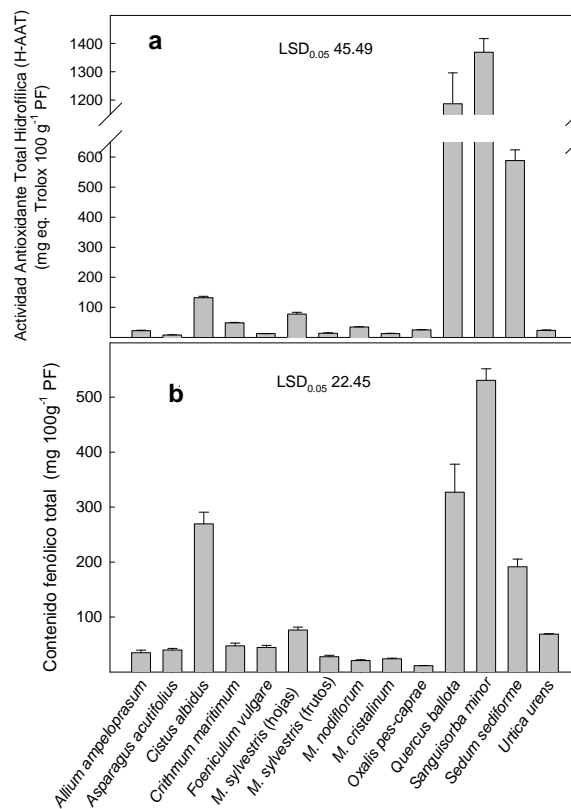


Figura 1. (a) H-AAT, actividad antioxidante hidrofílica (mg eq. Trolox 100 g<sup>-1</sup> PF), (b) contenido fenólico total (mg 100 g<sup>-1</sup> PF) de diferentes plantas comestibles silvestres. Los datos son la media ± EE. LSD (p<0,05).

Tabla 2. Propiedades sensoriales más destacadas para la cocina creativa de distintas plantas comestibles silvestres (media ± SE).

Especies	Forma de consumo s <sup>a</sup>	Dulzor	Acidez	Aroma	Aceptación global	Propiedades más importantes para la cocina creativa <sup>b</sup>
<i>Allium ampeloprasum</i> .	Cocida	6,88 ± 0,75	3,13 ± 0,13	8,63 ± 0,53	8,13 ± 0,33	Aroma, sabor picante
<i>Asparagus acutifolius</i>	Cocida	7,67 ± 0,17	2,00 ± 0,58	8,00 ± 0,29	9,67 ± 0,17	Aroma, textura
<i>Cistus albidus</i>	Cruda	6,40 ± 0,52	1,20 ± 0,38	2,40 ± 0,33	5,80 ± 0,38	Color, aspecto
<i>Crithmum maritimum</i>	Cocida	4,33 ± 1,01	7,00 ± 0,58	9,00 ± 0,29	2,01 ± 0,50	Textura, sabor salado
<i>Foeniculum vulgare</i>	Cocida	6,38 ± 0,84	3,13 ± 0,57	9,00 ± 0,46	5,13 ± 0,78	Aroma
<i>Malva sylvestris</i> (hojas)	Cocida	5,20 ± 0,52	1,80 ± 0,47	4,00 ± 0,54	5,01 ± 0,46	Textura, aspecto
<i>Malva sylvestris</i> .(frutos)	Cruda	5,20 ± 0,59	4,20 ± 0,99	3,20 ± 0,80	5,20 ± 0,75	Textura
<i>M. nodiflorum</i>	Cruda	2,25 ± 0,72	2,00 ± 0,78	4,25 ± 0,60	5,02 ± 0,24	Textura, sabor salado
<i>M. cristalinum</i>	Cruda	2,00 ± 0,58	3,00 ± 0,85	5,25 ± 0,49	6,00 ± 0,24	Textura, sabor salado
<i>Oxalis pes-caprae</i>	Cruda	1,75 ± 0,28	8,75 ± 0,14	3,75 ± 0,49	4,00 ± 0,62	Textura, sabor ácido
<i>Quercus ballota</i>	Cocida	8,50 ± 0,37	0,75 ± 0,14	9,50 ± 0,17	9,25 ± 0,28	Aroma, sabor dulce
<i>Sanguisorba minor</i>	Cruda	2,60 ± 0,44	3,00 ± 0,54	2,60 ± 0,44	4,8 ± 0,12	Aspecto
<i>Sedum sediforme</i>	Cocida	2,00 ± 0,29	4,67 ± 0,17	7,33 ± 0,17	1,67 ± 0,17	Textura, aspecto
<i>Urtica urens</i>	Cocida	5,25 ± 0,86	4,00 ± 0,75	6,25 ± 0,60	5,00 ± 0,47	Textura
LSD <sub>0,05</sub> <sup>d</sup>		0,84	0,78	0,65	0,61	

<sup>a</sup>Forma de consumo por parte del panel de catadores (crudas o cocidas).

<sup>b</sup>Propiedades más relevantes para la cocina creativa que fueron destacadas por el panel de catadores.

<sup>c</sup>LSD (p<0.05), diferencia mínima significativa entre medias de diferentes muestras.

## Degradación Térmica del $\gamma$ -orizanol en Pastas Sin Gluten

S. Soto, M. Boluda, A. López

Departamento de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena, España. sonia.soto@upct.es

### RESUMEN

La harina de arroz es el cereal más adecuado para elaborar productos sin gluten, debido a sus propiedades nutricionales y antioxidantes, y a su alto contenido en  $\gamma$ -orizanol. Además también posee propiedades hipoalergénicas y un color y aroma suave. Dado el gran interés del  $\gamma$ -orizanol desde el punto de vista nutracéutico, y a que existen pocos estudios sobre el efecto de la cocción de alimentos sin gluten (elaborados con harina de arroz) sobre el contenido de  $\gamma$ -orizanol, en este trabajo se estudia el efecto del tratamiento térmico sobre la degradación del  $\gamma$ -orizanol contenido en las pastas. Este tratamiento se ha realizado mediante diferentes técnicas, habituales en los procesos de cocinado, como son el horno de vapor (120 °C), el horno de aire caliente a 100 °C o 230 °C o microondas a 650 W o 850 W. Se determinó el contenido de este compuesto antes y después de la cocción de pasta sin gluten elaborada con harina de arroz (blanco e integral), en estado fresco y congelado. La determinación del  $\gamma$ -orizanol se llevó a cabo mediante un método de extracción por Soxhlet y una posterior medida en espectrofotometría. La pasta cruda tenía un contenido de  $\gamma$ -orizanol de  $7,63 \pm 2,34$  mg/kg en pasta de arroz blanco, y de  $65,60 \pm 13,05$  mg/kg en las pastas de arroz integral. Los resultados muestran la estabilidad exhibida por este compuesto en los diferentes tipos de cocinado, con independencia del estado inicial de la pasta (fresca o congelada) o el tiempo del tratamiento (5 y 15 minutos).

**Palabras clave:** arroz integral, arroz blanco, antioxidantes, cocinado de pastas.

### 1. Introducción

Cada vez se registran más casos de enfermos celíacos. La causa de esta enfermedad es la ingestión de gluten en la dieta, afectando a la absorción de nutrientes importantes como el hierro, ácido fólico, calcio y vitaminas liposolubles. Actualmente se estima que aproximadamente en Europa 1:200-350 personas, y en EE.UU. 1:250-500 personas sufren esta enfermedad [1]. El mercado demanda productos sin gluten, con mayor calidad y menor precio. La harina de arroz parece ser el cereal más adecuado para el desarrollo de estos productos, además de poseer propiedades nutricionales, hipoalergénicas, y tener un color y un sabor suave.

El arroz constituye la principal fuente mundial de alimentos. Se consume comúnmente como arroz blanco, que se obtiene mediante el descascarillado y molienda del arroz. La eliminación del salvado del arroz incrementa el nivel de almidón en el arroz y reduce los niveles de lípidos y proteínas [2]. El  $\gamma$ -orizanol se encuentra principalmente en las capas de salvado, actuando como un antioxidante natural [3]. Muchos compuestos bioactivos, además del  $\gamma$ -orizanol, no existen de manera uniforme en el grano del cereal, concentrándose en las capas

exteriores y el salvado, por lo que se recomienda el consumo de granos enteros en las comidas, ya que proporciona beneficios para la salud más allá de la nutrición básica, y reduce los riesgos de muchas enfermedades crónicas [4].

El  $\gamma$ -orizanol es un compuesto antioxidante, asociado comúnmente con la disminución del colesterol, también se ha utilizado para tratar la hiperlipidemia, trastornos de la menopausia y para aumentar la masa muscular [5]. A nivel molecular y celular, los antioxidantes sirven para desactivar ciertas partículas llamadas radicales libres. Los radicales libres son subproductos naturales de muchos procesos metabólicos oxidativos en las células. Estos radicales libres pueden causar daños a las paredes celulares, en las estructuras celulares y en el material genético [5].

Los platos preparados a base de harina de arroz, elaborados mediante diferentes tratamientos térmicos de cocinado, pueden cambiar sus propiedades nutricionales, el contenido en  $\gamma$ -orizanol puede perderse durante el proceso de cocción. Para recibir los beneficios del  $\gamma$ -orizanol, el compuesto debe ser estable durante los

procesos de preparación de alimentos, ya que puede perderse durante la oxidación térmica que se produce durante la cocción de la comida [6].

En este trabajo se ha realizado un estudio del contenido de  $\gamma$ -orizanol en pastas elaboradas con harina de arroz y se ha analizado la influencia de los diferentes tipos de cocinado, habituales para este tipo de platos preparados, sobre el contenido en este antioxidante.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Materiales

Harina de arroz blanco y harina de arroz integral (Emilio Esteban, S.A.), harina fina de maíz (Maizena, adquirida en supermercado), E-415 y E-471 (Doscadesa, S.L.), albúmina en polvo (Huevos Inmaculada). Patrón de  $\gamma$ -orizanol adquirido a la empresa Wako Pure Chemical Industries Ltd., n-hexano calidad HPLC de la marca Lab-Scan de POCH S.A., y Acetona Panreac Química S.L.U.

### 2.2 Preparación de las muestras

Las pastas de arroz fueron elaboradas en laboratorio mediante la siguiente formulación: 83.96% de harina de arroz blanco o integral; 11.77% de harina fina de maíz (Maizena); 3.84% de albúmina en polvo; 0.24% de goma xantana; 0.19% de E-471. La proporción de agua añadida difiere de si la composición contiene harina de arroz blanco, con un 41.2% de agua con respecto al peso seco, o con un 33.6% de agua con respecto al peso seco total de la formulación cuando incorpora harina de arroz integral.

Las diferentes formulaciones de pasta fueron elaboradas en la máquina para la elaboración de pastas modelo Dolly (La Monferrina S.R.L.)

Todas las variantes elaboradas, mediante harina de arroz integral o harina de arroz blanco, se sometieron a un proceso de pre-cocción en agua hirviendo durante 3:30 min, con un posterior enfriado con agua fría durante 30 segundos. La mitad de las muestras fue congelada (-20°C) y la otra mitad se conservó en refrigeración (5°C). Todas estas formulaciones se sometieron a diferentes tratamientos térmicos habituales para el cocinado de este tipo de productos. Fueron los siguientes:

Horno microondas (MW) (Whirlpool, modelo FT 339): 650 y 850 W

Horno a presión de vapor (Vapor Presión) (Miele, modelo DG 4064): 120°C

Horno convección forzada (Aire Caliente) (Bosch, modelo HBC 36D7.3.): 100 y 230°C

Los tratamientos térmicos tuvieron una duración de 5 y 15 minutos.

Una vez las muestras recibieron el tratamiento térmico correspondiente, fueron secadas en una estufa a 70°C hasta peso constante, y posteriormente molidas hasta obtener una granulometría homogénea.

### 2.3 Extracción y cuantificación de $\gamma$ -Orizanol presente en las muestras

El  $\gamma$ -orizanol se ha extraído de las muestras [7] mediante un equipo Soxhlet de extracción (de 125mL de Labbox Labware S.L.), durante 3h, usando hexano como disolvente, sobre una placa calefactora (Placa Selecta Combiplac 3000156), después se evapora el extracto usando un evaporador rotatorio a 30°C (Heidolph VV2000, de tanque de agua WB2000), finalmente, el extracto es recuperado con acetona.

La medición del contenido en  $\gamma$ -orizanol de las muestras se realizó mediante espectrofotometría [2], usando una absorbancia de 350 nm. Para la elaboración de la curva patrón se usó acetona como disolvente.

### 2.3 Análisis estadístico

Los datos (tres repeticiones) se analizaron mediante el paquete estadístico Statgraphics Plus. Se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) con una significación de  $P < 0.05$  para determinar los posibles efectos de los tipos y tiempos de cocinado sobre el contenido de  $\gamma$ -orizanol en pastas de arroz.

## 3. Resultados y Discusión

Existe una variación significativa entre el contenido en  $\gamma$ -orizanol hallado en las pastas elaboradas con harina de arroz integral (Tabla 1) y las elaboradas con harina de arroz blanco (Tabla 2). La pasta de arroz integral presenta aproximadamente un contenido de 65 mg/kg de  $\gamma$ -orizanol mientras que la pasta de arroz blanco muestra un 7.6 mg/kg de  $\gamma$ -orizanol. Es evidente que el descascarillado y la molienda del arroz integral para producir arroz blanco supone una pérdida de un 88% de  $\gamma$ -orizanol, que se concentra en el salvado del arroz. Este resultado



se explica porque la concentración de  $\gamma$ -orizanol presente en el arroz depende de la variedad y de las condiciones ambientales y de cultivo, pero sobre todo depende de la molienda, ya que se produce un descenso en la concentración de estos compuestos por la pérdida del salvado de arroz y de las capas más externas del grano, que es donde se encuentra la mayor parte del  $\gamma$ -Orizanol [8].

En las Tablas 1 y 2, se muestran los datos obtenidos para cada uno de los tipos de cocinado usados, así como los tiempos de cocinado, en función del estado inicial de la muestra (fresca o congelada) y de si está elaborada con harina de arroz integral o harina de arroz blanco.

Tanto para la pasta elaborada con harina de arroz integral (Tabla 1) como para la pasta elaborada con harina de arroz blanco (Tabla 2) la etapa de cocinado, en los diferentes tipos de hornos, con diferentes tiempos, independientemente de si las muestras se encuentran frescas o congeladas, parecen no tener influencia en el contenido en  $\gamma$ -orizanol. El proceso de congelación previo al cocinado tampoco parece tener influencia sobre el contenido en  $\gamma$ -orizanol para ninguno de los tipos y tiempos de cocción estudiados.

En las muestras analizadas en este trabajo no se ha apreciado una variación significativa de valores que no se pueda atribuir a la heterogeneidad de la concentración de  $\gamma$ -orizanol en la harina de arroz empleada en las pastas, o a las distintas variedades de arroz empleadas.

#### 4. Conclusiones

El  $\gamma$ -orizanol es un antioxidante presente en el arroz, que es estable térmicamente frente a las condiciones de cocinado habituales de los platos preparados, como son el calentamiento en horno microondas, en horno convencional o en horno a vapor, para los tiempos de 5 y 15 minutos de tratamiento, para la pasta fresca o congelada.

El consumo de platos preparados, fáciles y rápidos de cocinar, son cada vez más frecuentes en los consumidores, garantizando así la ingesta de sus propiedades antioxidantes del mismo modo que si se elaborase de forma casera.

Las pastas elaboradas a partir de harina de arroz son productos funcionales, ya que son aptos para enfermos celíacos, pero además poseen el valor añadido de contener  $\gamma$ -orizanol, un antioxidante

que puede reducir el colesterol, y las enfermedades del corazón, y que tiene propiedades anticancerígenas.

#### 5. Agradecimientos

A la empresa Audens Food S.A., por su ayuda en la financiación del proyecto denominado “Tecnologías Avanzadas para la Fabricación de Platos a Base de Arroz” (Proyecto CDTI 2010 de Investigación Industrial Concertada, ref IDI-20100795).

#### 6. Referencias bibliográficas

- [1] Sozer, N. 2009. Rheological properties of rice pasta dough supplemented with proteins and gums. *Food Hydrocolloids*, 23: 849-855.
- [2] Ha, T.-Y., Ko, S.-N., Lee, S.-M., Kim, H.-R., Chung, S.-H., Kim, S.-R., Yoon, H.-H., Kim, I.-H. 2006. Changes in nutraceutical lipid components of rice at different degrees of milling. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108: 175-181.
- [3] Chamnarnsin, P., Ahromrit, A. 2011. Effect of Heating on Gamma-Oryzanol Content and Degree of Gelatinization of Thai Coloured Rice. En: *The 12 th Asean Food Conference 2011*, Bitec, Bangkok, Thailand.
- [4] Lin, P.-Y. and Lai, H.-M. 2011. Bioactive compounds in rice during grain development. *Food Chemistry*, 127: 86-93.
- [5] Patel, M. & Naik, S.N. 2004. Gamma-oryzanol from rice bran oil – A review. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 63: 569-578.
- [6] Khuwijitjaru, P., Taengtieng, N., Changprasit, S. 2004. Degradation of Gamma-Oryzanol in Rice Bran Oil during Heating: An Analysis Using Derivative UV-spectrophotometry. *Silpakorn University, International Journal* 4: 154-165.
- [7] Zullaikah, S., Lai, C.-C., Vali, S.R., Ju, Y.-H. 2005. A two-step acid-catalyzed process for the production of biodiesel from rice bran oil. *Bioresource Technology* 96: 1889-1896.
- [8] Miller, A., Engel, K.-H. 2006. Content of  $\gamma$ -Oryzanol and composition of sterylferulates in brown rice (*Oryza sativa* L.) of European origin. *Journal Agricultural of Food Chemistry*, 54: 8127-8133.

## Tablas y Figuras

**Tabla 1.** Contenido de  $\gamma$ -Orizanol en pastas elaboradas con harina de arroz integral, antes y después de aplicar los diferentes tratamientos térmicos (5 y 15 min).

<b>Pastas Elaboradas con Harina de Arroz Integral</b>								
<b>Cocinadas Frescas</b>				<b>Cocinadas Congeladas</b>				
		mg/kg	SD			mg/kg	SD	
<b>5'</b>	Vapor Presión 120°	<b>69,21</b>	4,12	<b>a</b>	Vapor Presión 120°	<b>68,03</b>	2,41	<b>a</b>
	MW 850W	<b>60,15</b>	1,46	<b>b</b>	MW 850W	<b>51,10</b>	10,33	<b>b</b>
	MW 650W	<b>56,71</b>	3,36	<b>b</b>	MW 650W	<b>43,06</b>	9,04	<b>cd</b>
	Aire Caliente 230°C	<b>48,36</b>	3,14	<b>c</b>	Aire Caliente 230°C	<b>41,82</b>	2,42	<b>c</b>
	Aire Caliente 100°C	<b>59,24</b>	7,12	<b>b</b>	Aire Caliente 100°C	<b>50,04</b>	2,55	<b>d</b>
<b>15'</b>	Vapor Presión 120°	<b>64,11</b>	11,02	<b>ab</b>	Vapor Presión 120°	<b>51,81</b>	32,86	<b>a</b>
	MW 850W	<b>78,41</b>	4,35	<b>a</b>	MW 850W	<b>63,92</b>	5,99	<b>a</b>
	MW 650W	<b>68,04</b>	2,50	<b>a</b>	MW 650W	<b>57,56</b>	11,60	<b>b</b>
	Aire Caliente 230°C	<b>63,72</b>	2,88	<b>ab</b>	Aire Caliente 230°C	<b>68,14</b>	10,57	<b>a</b>
	Aire Caliente 100°C	<b>62,84</b>	2,77	<b>b</b>	Aire Caliente 100°C	<b>69,99</b>	3,91	<b>a</b>
<b>Cruda antes de cocer la pasta</b>	<b>65,60</b>	13,05	<b>ab</b>		<b>47,58</b>	6,86	<b>bc</b>	

**Tabla 2.** Contenido de  $\gamma$ -Orizanol en pastas elaboradas con harina de arroz blanco, antes y después de aplicar los diferentes tratamientos térmicos (5 y 15 min).

<b>Pastas Elaboradas con Harina de Arroz Blanco</b>								
<b>Cocinadas Frescas</b>				<b>Cocinadas Congeladas</b>				
		mg/kg	SD			mg/kg	SD	
<b>5'</b>	Vapor Presión 120°	<b>4,11</b>	1,30	<b>a</b>	Vapor Presión 120°	<b>3,68</b>	0,50	<b>a</b>
	MW 850W	<b>5,24</b>	1,95	<b>ac</b>	MW 850W	<b>3,38</b>	0,45	<b>a</b>
	MW 650W	<b>2,34</b>	0,09	<b>b</b>	MW 650W	<b>3,14</b>	0,89	<b>ab</b>
	Aire Caliente 230°C	<b>6,73</b>	1,98	<b>ac</b>	Aire Caliente 230°C	<b>3,87</b>	2,12	<b>a</b>
	Aire Caliente 100°C	<b>8,48</b>	1,60	<b>c</b>	Aire Caliente 100°C	<b>4,12</b>	1,11	<b>a</b>
<b>15'</b>	Vapor Presión 120°	<b>7,92</b>	1,14	<b>c</b>	Vapor Presión 120°	<b>3,02</b>	2,11	<b>abc</b>
	MW 850W	----	----		MW 850W	----	----	
	MW 650W	<b>3,45</b>	0,67	<b>a</b>	MW 650W	<b>6,10</b>	0,57	<b>c</b>
	Aire Caliente 230°C	<b>3,17</b>	0,45	<b>a</b>	Aire Caliente 230°C	<b>3,93</b>	0,94	<b>a</b>
	Aire Caliente 100°C	<b>3,62</b>	0,91	<b>a</b>	Aire Caliente 100°C	<b>3,29</b>	1,13	<b>ab</b>
<b>Cruda antes de cocer la pasta</b>	<b>7,63</b>	2,34	<b>ac</b>		<b>6,32</b>	1,50	<b>ac</b>	

## Efecto combinado de nisina y *D*-limoneno sobre *Listeria monocytogenes* aplicados mediante nanoemulsiones

J. Maté, P. M. Periago, A. Palop

Universidad Politécnica de Cartagena, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Dpto. Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena, Murcia, España. [j\\_ms\\_86@hotmail.com](mailto:j_ms_86@hotmail.com)

### RESUMEN

La nisina y el *D*-limoneno son compuestos naturales con carácter antimicrobiano. Durante la última década, algunas investigaciones han llegado a la conclusión de que el empleo combinado de algunos aceites esenciales con la nisina podría presentar cierto efecto sinérgico. Entre los principales inconvenientes del empleo de estos compuestos en la industria alimentaria destacan su baja estabilidad debido a su naturaleza oxidativa, su pronunciado carácter aromático y a su carácter hidrofóbico. El objetivo de este estudio fue evaluar el posible efecto sinérgico de nisina y *D*-limoneno en *Listeria monocytogenes*, al aplicarlos mediante una nanoemulsión. Los resultados evidenciaron un notable efecto sinérgico al emplearse de manera combinada la nisina con el *D*-limoneno, siendo este efecto más evidente al aplicarlos en forma de nanoemulsión que por medio de la adición directa de los mismos. Los datos mostraron una disminución de los recuentos en 2 unidades logarítmicas cuando se aplicaron la nisina y el *D*-limoneno de manera directa, y de 4 unidades logarítmicas en el caso de aplicarlos en forma de nanoemulsión. Estos datos ponen de manifiesto que el empleo de aceites esenciales en forma de nanoemulsión podría tener numerosas aplicaciones en la industria alimentaria solventando los problemas anteriormente mencionados.

**Palabras clave:** Antimicrobianos naturales, seguridad alimentaria, método CPI, carácter hidrofóbico.

### 1. Introducción

Durante los últimos años, la industria alimentaria ha favorecido la introducción, de antimicrobianos de origen natural en contra de los de origen sintético, ya que ha quedado documentado que los de origen natural generan menores problemas de intolerancias en humanos e incluso que algunos de los de origen sintético podrían generar sustancias tóxicas y carcinogénicas en nuestro organismo [1].

Se han desarrollado varios experimentos donde se ha evaluado el carácter antimicrobiano del *D*-limoneno frente a diferentes patógenos alimentarios como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aureginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Saccharomyces bayanus* entre otros [3]. En muchos de estos casos se obtuvieron resultados satisfactorios. Sin embargo, la naturaleza hidrofóbica de los

aceites esenciales, que los hacen inmiscibles en agua, la susceptibilidad de los mismos a la degradación oxidativa, la cual disminuye considerablemente su efecto, y su pronunciado carácter aromático, ha reducido su empleo por parte de la industria alimentaria.

Algunos grupos de investigación han centrado su atención en solventar estos problemas. Bien por medio de la combinación de varios aceites esenciales [4], o la combinación de los mismos con otras sustancias con carácter antimicrobiano como podría ser la nisina [5]. En estos casos se apreció efecto sinérgico, lo cual aumentó la efectividad de ambas sustancias al emplearlas conjuntamente. Este efecto sinérgico paliaría en cierta medida, la disminución del efecto de los aceites esenciales por la degradación oxidativa y, por otro lado, permitiría disminuir las dosis de los mismos, disminuyendo el rechazo a usarlos por su fuerte aroma. Pero no solventaría el problema de la

inmiscibilidad de los aceites esenciales en medio acuoso. Para ello, en los últimos dos años, ha comenzado a aplicarse la tecnología de nanoemulsiones, por medio del método de Inversión de Fase Catastrófica (CPI). El método CPI se encuentra entre los catalogados de “baja energía”. Además cuenta con las ventajas de su escaso coste y el aprovechamiento de la energía química almacenada en el sistema. La nanoemulsión presenta dos fases o componentes, una fase acuosa (A) constituida por una mezcla de agua y propilenglicol y una fase oleosa (O), preparada a partir de una mezcla del aceite que se pretende emulsionar con Tween 80. Las nanoemulsiones, debido a su tamaño subcelular, proporcionan un enfoque eficaz para mejorar la estabilidad física de las sustancias activas encapsuladas y aumentar la distribución de los agentes antimicrobianos en matrices de alimentos donde se encuentran los microorganismos [6]. Aun habiendo pocos estudios actualmente, las nanoemulsiones con aceites esenciales han demostrado que presentan excelentes propiedades antimicrobianas contra una amplia variedad de microorganismos, siendo incluso necesarias menores cantidades de los mismos para conseguir un efecto similar o incluso mayor [7].

Tan sólo hay constancia de un estudio, publicado a finales de 2013, donde se evaluó el efecto antimicrobiano de una nanoemulsión elaborada a partir de los antimicrobianos nisina y D-limoneno. En el mismo se evaluó dicho efecto frente a bacterias Gram positivas de las especies *S. aureus* y *Bacillus subtilis*, bacterias Gram negativas de la especie *E. coli* y hongos de la especie *S. cerevisiae*. Para ello se representaron los datos en forma de concentraciones mínimas inhibitorias e imágenes de microscopía electrónica de barrido [9].

El objetivo principal de este estudio fue evaluar el efecto antimicrobiano de la adición conjunta de nisina y D-limoneno frente a *Listeria monocytogenes* en caldo de cultivo TSB (tryptic soy broth), comparando el efecto de la adición directa de los mismos al medio de cultivo, con el efecto de la adición de una nanoemulsión elaborada a partir de estos dos antimicrobianos. Para ello se prepararon nanoemulsiones mediante el método CPI (Inversión de Fase Catastrófica), se desarrollaron curvas de supervivencia por medio de recuento en placa y curvas de crecimiento por absorbancia a distintas concentraciones de antimicrobianos.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

En los experimentos se utilizó la cepa de *L. monocytogenes* CECT 4032. Fue suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Las células se hicieron crecer a 37°C en caldo TSB (Scharlau Chemie S. A., Barcelona, España) complementado con 0,5% de glucosa (p/v). Los cultivos se mantuvieron a -80°C en glicerol al 30% como crioprotector. Para preparar los inóculos se hacía crecer el microorganismo durante toda la noche en TSB a 37°C.

### 2.2 Antimicrobianos

La nisina se obtuvo de Sigma Aldrich Chemie, (Steinheim, Alemania). Fue disuelta en etanol al 50% (v/v) (Panreac, Barcelona, España). La solución de trabajo fue preparada a una concentración final de 30 µM y almacenada en refrigeración hasta su uso. Las concentraciones ensayadas de nisina fueron 0.075 µM para los estudios de inactivación y 0.0375 µM para los de crecimiento.

El D-limoneno se obtuvo de sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania). Fue disuelto en etanol al 95% (v/v) (Panreac, Barcelona, España). La solución de trabajo fue preparada a una concentración final de 100 mM y almacenada en oscuridad y en condiciones de refrigeración hasta su uso. La concentración ensayada de D-limoneno fue 1 mM en todos los experimentos.

### 2.3 Preparación de la nanoemulsión con inversión de fase catastrófica (CPI)

Para la elaboración de la nanoemulsión de nisina y D-limoneno se siguió el protocolo desarrollado por Zhang et al., 2013. Con el objetivo de comprobar la estabilidad de la nanoemulsión, los experimentos se hicieron por duplicado y con una separación entre experimentos de ocho semanas, no apreciándose diferencias significativas.

### 2.4 Curvas de supervivencia

Para realizar el recuento de formas viables se partió de un inóculo preparado 24 horas antes del experimento en caldo TSB e incubado a 37 °C. A continuación se sembraron tubos con 4 mL de caldo TSB previamente atemperado a 37°C, presentando éstos una concentración inicial de aprox. 10<sup>6</sup> ufc/mL. Seguidamente se añadieron los antimicrobianos a las concentraciones

indicadas anteriormente y se incubaron a 37°C. Se tomaron muestras cada 30 min, hasta 90 min. Posteriormente se realizó la siembra en placa por duplicado en medio TSA de cada una de las diluciones adecuadas en agua de peptona (Scharlau). Las placas fueron incubadas durante 24h a 37°C.

### 2.5 Curvas de crecimiento

El crecimiento en presencia de los antimicrobianos se determinó mediante absorbancia en un Bioscreen C (Lab Systems, Helsinki, Finlandia). Se partió de tubos con 4 mL de caldo TSB que contenían una concentración inicial de  $10^3$  ufc/mL. Seguidamente se añadieron los antimicrobianos a las concentraciones indicadas anteriormente y se pipetearon 400  $\mu$ L del cultivo con los antimicrobianos en cada uno de los pocillos de la microplaca del Bioscreen. Las microplacas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas, midiéndose densidades ópticas en intervalos de 15 minutos a un rango de longitudes de onda de 420-580 nm (*wideband*).

El cálculo de los parámetros de crecimiento (duración de la fase de latencia y velocidad de crecimiento) se realizó mediante el modelo de Baranyi y Roberts (1993), a través del software DMFit.

## 3. Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos en el recuento de supervivientes, para los casos en los que se aplicaron los antimicrobianos nisina y *D*-limoneno de manera individualizada y directa, a las concentraciones anteriormente indicadas, no mostraron diferencias significativas con respecto al control, no fue así al aplicar el *D*-limoneno en forma de nanoemulsión, donde se obtuvo una disminución de la población, a los 90 minutos, de dos ciclos logarítmicos con respecto al control (Figura 2). Por otro lado, al combinar los antimicrobianos, se apreció una disminución evidente de la población inicial del microorganismo; en el caso de la aplicación directa de los antimicrobianos se obtuvo una disminución de hasta 3 ciclos logarítmicos a los 90 minutos respecto a la población inicial a tiempo 0. Mientras que al aplicar los antimicrobianos en forma de nanoemulsión, a los 90 minutos, esta disminución fue de 4 ciclos logarítmicos respecto a la población inicial a tiempo 0 (Figura 1). En ambos casos se partió de una concentración inicial del microorganismo de  $10^6$  ufc/mL.

Las curvas de crecimiento por medio de densidades ópticas en el Bioscreen mostraron, en los casos donde se empleó la emulsión de limoneno de manera individual y la combinación de antimicrobianos de manera directa, un aumento de la fase de latencia con respecto al control de 10.9 y 10.4 horas respectivamente (Tabla 1), con velocidades de crecimiento de 0.027 y 0.037 uds D.O. por hora, siendo en este caso la velocidad de crecimiento del control de 0.120 uds. D.O. por hora. Además en ambos casos se pudo apreciar una menor densidad óptica final, la cual fue levemente mayor al emplear los antimicrobianos de manera combinada. Al ser aplicados en forma de emulsión, se pudo comprobar la inhibición del crecimiento del microorganismo durante las 100 horas que duró el experimento (Figura 3). En todos los casos se partió de una concentración inicial del microorganismo de  $10^3$  ufc/mL.

Si bien no existen muchos trabajos en los que se haya evaluado el efecto antibacteriano de las nanoemulsiones, los datos obtenidos en nuestro experimento coinciden con los datos publicados [8], lo que indica que la aplicación de nisina y *D*-limoneno en forma de nanoemulsión sería más eficaz frente a *L. monocytogenes*, que cuando los compuestos son añadidos directamente al medio. El empleo de los antimicrobianos en forma de nanoemulsión da lugar, a priori, a un producto miscible en medio acuoso, estable a lo largo del tiempo y, al potenciar notablemente el efecto antimicrobiano de esta combinación, se estaría contrarrestando en cierta medida la pérdida de eficacia que sufren los aceites esenciales debida a la oxidación. Además de conseguir disminuir las concentraciones utilizadas hasta límites organolépticamente aceptados.

## 4. Conclusiones

Existe un efecto sinérgico al emplear de manera combinada la nisina y el *D*-limoneno, frente al microorganismo objeto de estudio. Este efecto sinérgico se manifestó de manera mucho más evidente al aplicar los antimicrobianos en forma de nanoemulsión.

Como futuras pruebas o análisis pendientes de realizar, sería conveniente realizar un ensayo de vida útil en algún producto alimenticio para evaluar el efecto de esta nanoemulsión en alimentos. También se debería realizar un análisis organoléptico, por medio de un panel de catadores, de los productos diana para evaluar la aceptación por el consumidor. Otros ensayos pendientes de realizar serían los relacionados

con el estudio de la termorresistencia de estos compuestos en forma de nanoemulsiones, no sólo para evaluar la estabilidad de las mismas al aumentar la temperatura, sino para comprobar si existiría cierto efecto sinérgico al emplear estas dos técnicas de manera conjunta.

### 5. Agradecimientos

Esta investigación ha sido posible gracias a la financiación por parte del Ministerio de Ciencia e Innovación y fondos FEDER a través de los proyectos AGL- 2010-19775 y AGL2010-22206-C02-02.

### 6. Referencias bibliográficas

[1] Fleming-Jones M.E., Smith, R.E. 2003. Volatile organic compounds in foods: A five year study. *J. agr. food. chem.* 51(27): 8120–8127.

[2] Sun J. 2007. D-Limonene: Safety and clinical applications. *Altern. Med. Rev.* 12(3): 259.

[3] Chikhoun A., Hazzit M., Kerbouche L., Baaliouamer A., Aissat K. 2013. *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters essential oils: Chemical composition and biological activities. *J. Essent. Oil Res.* 1–8.

[4] Gutierrez J., Barry-Ryan C., Bourke P. 2009. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiol.* 26(2): 142–150.

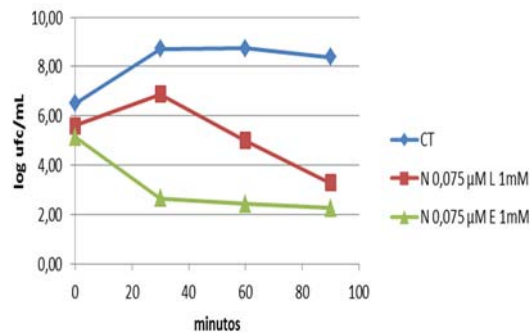
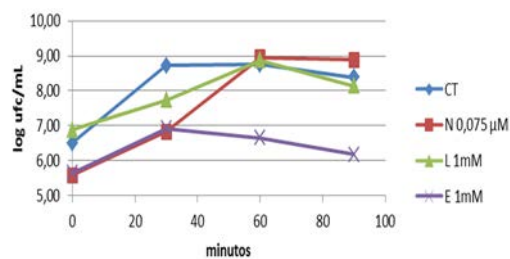
[5] Periago PM., Palop A., Fernandez PS. 2001. Combined Effect of Nisin, Carvacrol and Thymol on the Viability of *Bacillus cereus* Heat-Treated Vegetative Cells. *Food Sci. technol. int.* 7: 487-492.

[6] Weiss J., Gaysinsky S., Davidson M., McClements J. 2009. Nanostructured encapsulation systems: Food antimicrobials. *Global issues in food science and technology.* 425–480.

[7] Donsì F., Annunziata M., Sessa M., Ferrari G. 2011. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT-Food Sci. Technol.* 44(9): 1908–1914.

[8] Zhang Z., Vriesekoop F., Yuan Q., Liang H. Effects of nisin on the antimicrobial activity of D-limonene and its nanoemulsión. 2013. *Food chem.* 150: 307-312.

### Tablas y Figuras



Figuras 1 y 2. Recuento de supervivientes durante los primeros 90 minutos tras la adición de los antimicrobianos. Se partió de una concentración inicial de microorganismo de  $10^6$  UFC/mL. Se evaluaron concentraciones de nisina (N) 0,075 µM y D-limoneno (L) y emulsión de D-limoneno (E) a 1 mM y sus combinaciones.

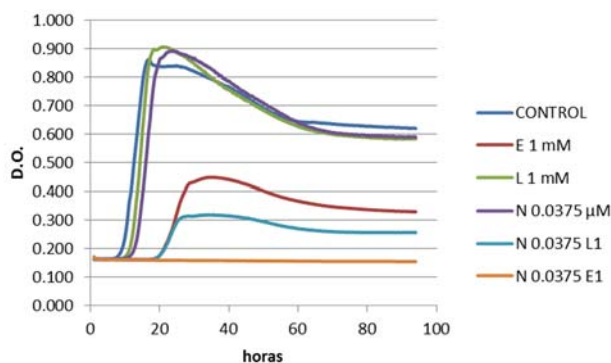


Figura 3. Curva de crecimiento de *Listeria monocytogenes* a 37°C en caldo TSB. Se partió de una concentración inicial de microorganismo de  $10^3$  UFC/mL. Se evaluaron concentraciones de nisina (N) 0,12 ppm (p/v) y D-limoneno (L) y emulsión de D-limoneno (E) a 1 mM.

**Tabla 1.** Parámetros cinéticos de las curvas de crecimiento de *Listeria monocytogenes* a 37°C en caldo TSB.

	VEL. CREC.	E. S. (VEL. CREC.)	LAT.	E. S. (LAT.)
CT	0.120	0.002	9.726	0.050
E1 mM			20.67	
			0	0.087
L1 mM			11.98	
			0	0.065
N 0.0375 µM			13.30	
N 0.0375 L1mM	0.125	0.003	0	0.080
N 0.0375 E1mM	0.027	0.001	0	0.173
	0.000	0.000	0.000	0.000

\*VEL. CREC.: Velocidad de crecimiento (unidades de D.O. por hora). E. S.: Error estándar. LAT: Duración de la fase de latencia en horas.

## Calidad funcional de dátiles tunecinos Deglet-Noor sometidos a baños térmicos como alternativa al bromuro de metilo

R. Ben Amor, E. Aguayo, M.D. de-Miguel

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena. España. rihabenamor@yahoo.fr

### RESUMEN

El sector del dátil tunecino está afectado por la polilla del dátil, *Ectomyelois ceratoniae*. Desde hace varias décadas, el bromuro de metilo (BM) ha sido el fumigante más empleado. Debido a su efecto nocivo sobre la salud y medio ambiente, su uso está restringido (PNUMA, 1992) y el desarrollo de técnicas alternativas son de gran interés. En este trabajo se estudia el efecto de diferentes tratamientos de baños térmicos (BT) sobre la calidad funcional de dátiles tunecinos variedad "Deglet-Noor". Se aplicaron tres tratamientos, con diferentes combinaciones de tiempo y temperatura: Testigo y BT de 50°C 10 min, 55°C 5 min ó 60 °C 3 min. Tras el enfriamiento de las muestras, se envasaron en tarrinas de polipropileno, conservándose en atmósfera de aire durante 30 días a 2°C. Los parámetros más afectados por los BT fueron: el contenido de polifenoles totales, la actividad antioxidante y los azúcares totales. El dátil "Deglet-Noor" toleró los BT estudiados presentándose como una posible alternativa para el control cuarentenario del insecto *Ectomyelois ceratoniae*.

**Palabras clave:** *Phoenix dactylifera*, polifenoles totales, FRAP, azúcares totales, agua caliente, frigoconservación.

**1. Introducción:** El sector phoenicol constituye una parte específica de la economía agrícola de Túnez y contribuye de manera significativa en el PIB nacional. Además, de su contribución económica, los dátiles son una fuente importante de subsistencia para la mayoría de la población en el sur de Túnez.

Desafortunadamente, la palmera datilera en Túnez, como principal zona productora y exportadora de dátiles, se enfrenta a varios problemas técnicos. Entre estas limitaciones, las plagas y enfermedades que se consideran una amenaza importante para el sector. La polilla de dátiles, *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae), es con diferencia el problema fitosanitario más importante de la producción de dátiles de Túnez. La infestación de dátiles en campo, durante el embalaje y el almacenamiento deprecia enormemente la calidad comercial del producto y pone en peligro las exportaciones tunecinas, en particular, para la variedad "Deglet-Noor". Desde hace varias décadas, el bromuro de metilo ha sido el fumigante empleado por excelencia para el control cuarentenario de una amplia gama de plagas. Debido a su efecto adverso sobre la salud humana y el medio ambiente, ya que se ha identificado como una sustancia destructora de la capa de ozono por el Protocolo de Montreal (PNUMA, 1992), su uso está restringido y resulta

de urgencia el desarrollo de nuevos tratamientos y técnicas alternativas. Se han investigado nuevas técnicas postcosecha, alternativas al bromuro de metilo, como la irradiación [1,2], tratamientos con microondas [3, 4], aceites esenciales [5, 6], ozono (O<sub>3</sub>) [4, 7]. Durante los últimos años ha habido un interés creciente en la aplicación de tratamientos térmicos postcosecha para el control de las plagas e insectos, evitar la pudrición por hongos y acelerar la maduración del fruto [8]. Parte de este interés surge porque hay una demanda creciente por la reducción de productos químicos postcosecha utilizados contra patógenos e insectos [9]. Los tratamientos térmicos pueden proporcionarse mediante baños de agua caliente, aire seco o vapor de agua. Los tratamientos de BT están teniendo éxito en la desinfestación de insectos [10], ya que el agua caliente es un medio de transferencia de calor más eficiente que el aire caliente [11], y cuando circula correctamente a través de una carga de fruta se establece un perfil uniforme de temperatura en el baño [9]. Esta técnica proporciona un tratamiento físico, no perjudicial y puede sustituir los productos químicos, siempre que se encuentre una óptima combinación de tiempo y temperatura y no conlleven una pérdida significativa de la calidad del dátil [9].

Por todo lo expuesto, el objetivo del presente trabajo se centra en la aplicación de diferentes tratamientos de agua caliente y su efecto en la calidad funcional del producto cuando son conservados durante 30 días a 2 °C.

**2. Materiales y Métodos:** Las muestras de dátiles, se adquirieron recién cosechadas de una plantación de dátiles en el último estado de madurez “Tamar” en el Sur de Túnez. El producto se cosechó en el mes de noviembre del 2011, fue transportado en cajas de plástico a 8°C hasta la UPCT (Cartagena, España), donde se conservó a 5°C durante 24 horas para su procesamiento.

La materia prima fue destriada, realizando una preselección visual. Los dátiles fueron agrupados en 4 tratamientos. En los tratamientos térmicos, se utilizó un baño de agua caliente con control de tiempo y temperatura.

Las combinaciones de tiempo/temperatura estudiadas fueron: 50 °C 10 min, 55 °C 5 min y 60 °C 3 min. El testigo no recibió ninguna inmersión en agua. Tras los tratamientos térmicos se procedió al enfriamiento de las muestras hasta alcanzar 23 °C.

Los dátiles fueron envasados en tarrinas de polipropileno, conservándose en atmósfera de aire, durante 30 días a 2 °C. Los parámetros evaluados fueron:

Contenido de polifenoles totales (Folin-Ciocalteu) [12].

Capacidad antioxidante (FRAP) [13].

Azúcares (Azúcares totales, sacarosa, glucosa, fructosa) [14].

Análisis estadístico (ANOVA).

### 3. Resultados y Discusión

**3.1. Contenido de polifenoles totales:** En la figura 1, se observa que los BT afectaron significativamente ( $p < 0.05$ ) al contenido de polifenoles totales, con una reducción considerable en comparación con el testigo (80,20 versus 90,09 mg de ácido gálico/100g). Conforme aumentó la temperatura de los BT, la reducción de los polifenoles totales fue más pronunciada, alcanzando las muestras de dátiles su contenido mínimo (78,26 mg de ácido gálico/100g para el BT de 60 °C 3 min). La frigoconservación no afectó a este parámetro.

Reducciones similares se encontraron en un estudio de BT realizados en mangos (*Mangifera indica* L.) [15].

**3.2. Actividad antioxidante (FRAP):** La actividad antioxidante de los dátiles (figura 2) siguió una tendencia similar al contenido de polifenoles, reduciéndose progresivamente conforme aumentaba la temperatura de los BT, con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las muestras de dátiles sujetas a BT y el testigo (64,73 versus 73,83 mg de ácido ascórbico/100g). El baño de 60 °C durante 3 min fue el que más afectó a la actividad antioxidante alcanzando los dátiles su valor mínimo de 62,51 mg de ácido ascórbico/100g. Contrariamente a nuestros resultados, estudios sobre granado (*Punica granatum* L., cv. Mollar de Elche) [16] mostraron que BT de 45 °C durante 4 min aumentaban la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles totales de la granada. Otros estudios realizados en naranja (*Fortunella japonica* Lour. Swingle, cv. Ovale) [17], revelaron que tanto la actividad antioxidante como el contenido de polifenoles totales no fueron afectados significativamente por los BT de 50 °C durante 2 min aplicados en las mencionadas frutas, aunque tendieron a una ligera reducción.

Igualmente, la conservación refrigerada afectó de forma significativa ( $p < 0.05$ ) a este parámetro. La actividad antioxidante disminuyó considerablemente en la muestras almacenadas 30 días a 2 °C en comparación con las muestras del día 0 (63,78 versus 69,68 mg de ácido ascórbico/100g), estos resultados coinciden con los obtenidos en naranja [17], en los que la duración de la conservación redujo significativamente la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles totales de la fruta.

**3.3 Azúcares totales:** Los azúcares totales (glucosa, fructosa y sacarosa) (tabla 1) fueron afectados significativamente ( $p < 0.05$ ) por los de BT, con reducciones en los tratamientos de 50 °C 10 min y 60 °C 3 min en comparación con el testigo (50,75 versus 54,40 g/100g). En otros estudios realizados en naranjas Tarocco [18], se ha observado que los BT redujeron la fructosa pero no afectaron al contenido de sacarosa y glucosa. La duración de la conservación frigorífica no tuvo influencia en las concentraciones de azúcares totales en las muestras de dátiles.

**4. Conclusiones:** El dátil “*Deglet-Noor*” tolera las temperaturas y duración de los BT estudiados permitiendo obtener una vida útil de 30 días. Esta técnica se presenta como una



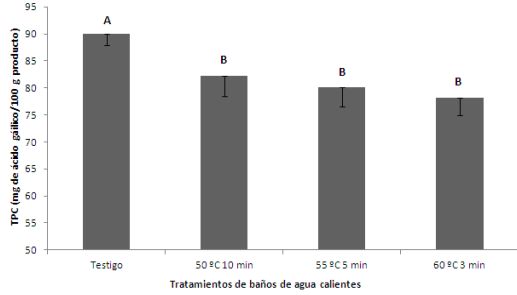
posible alternativa a la desinsectación por bromuro de metilo aunque afecta de forma significativa a la calidad funcional del dátil reduciendo el contenido en polifenoles totales, actividad antioxidante y azúcares totales.

**5. Agradecimientos:** Rihab Ben Amor agradece al programa Erasmus Mundus la beca otorgada para el desarrollo de este trabajo.

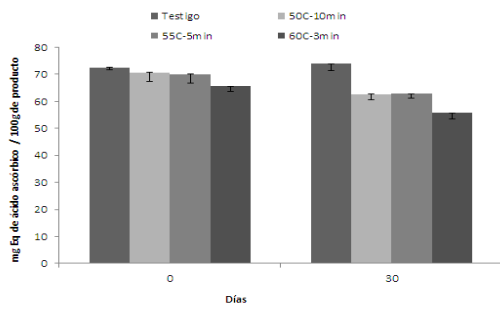
## 6. Referencias bibliográficas

- [1] AL-Kahtani H.A., Abu-Tarboush H.M., Al-Dryhim Y.N., Ahmed M.A., Bajaber A.S., Adam E.E. and El-Mojaddidi M. 1998. Irradiation of dates: insect disinfestation, microbial and chemical assessments, and use of thermoluminescence technique. *Radiat Phys Chem.* 53: 181-187
- [2] Azelmat K., El-Garrouj D., Mohammed Mouhib M. and Sayah F. 2006. Irradiation of 'Boufeggous' dates: Effects on chemical composition during storage. *Postharvest Biol Technol.* 39: 217-222.
- [3] Zouba A., Khoualdia O., Diaferia A., Rosito V., Bouabidi H. and Chermiti B. 2009. Microwave treatment for postharvest control of the date moth *Ectomyelois ceratoniae*. *Tunis J Plant Prot.* 4: 173-184.
- [4] Abo-El-Saad M.M., Elshafie H.A., Al Ajlan A.M. and Bou-Khowh I.A. 2011. Non-chemical alternatives to methyl bromide against *Ephestia cautella* (Lepidoptera: Pyralidae): microwave and ozone. *Agr Biol J N Am.* 2 (8): 1222-1231.
- [5] Haouel S., Mediouni-Ben Jemâa J. and Khouja M.L. 2010 Postharvest control of the datemoth *Ectomyelois ceratoniae* using eucalyptus essential oil fumigation. *Tunis J Plant Prot.* 5: 201-212.
- [6] Ben Jemâa J.M., Haouel S. and Khouja M.L. 2013. Efficacy of Eucalyptus essential oils fumigant control against *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae) under various space occupation conditions. *J Stored Prod Res.* 53: 67-71.
- [7] Jemni M., Otón M., Ramirez J.G., Artés-Hernández F., Chaira N., Ferchichi A. and Artés F. 2014. Conventional and emergent sanitizers decreased *Ectomyelois ceratoniae* infestation and maintained quality of date palm after shelf-life. *Postharvest Biol Technol.* 87: 33-41.
- [8] Finkelman S., Navarro S., Miriam R. and Dias R. 2006. Use of Heat for Disinfestation and Control of Insects in Dates: Laboratory and Field Trials. *Phytoparasitica.* 34: 37-48.
- [9] Lurie S. 1995. Postharvest heat treatments. *Postharvest Biol Technol.* 14: 257-269.
- [10] Couey H.M. 1989. Heat treatment for control of postharvest diseases and insect pests of fruits. *HortScienc.* 24: 198-201.
- [11] Shellie K.C. and Mangan R.L. 1994 Disinfestation: effect of non-chemical treatments on market quality of fruit. In: Champ, B.R. (Ed.), *Postharvest Handling of Tropical Fruits*, pp. 304 – 310, ACIAR Proceedings.
- [12] Artés-Hernández F., Robles P. A., Gómez P. A. Tomás-Callejas, A. and Artés F. 2010. Low UV-C illumination for keeping overall quality of fresh-cut watermelon. *Postharvest Biol Technol.* 55: 114-120.
- [13] Benzie I.F.F. and Strain J.J. 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. In *Methods in Enzymology*, 299: 15-27 [L Packer, editor]. Orlando, FL: Academic Press.
- [14] Moraga G., Martínez-Navarrete N., and Chiralt A. 2006. Compositional changes of strawberry due to dehydration, cold storage and freezing-thawing processes. *J Food Process Pres.* 30: 458-474.
- [15] Kim Y., Lounds-Singleton A. J. and Talcott S. T. 2009. Antioxidant phytochemical and quality changes associated with hot water immersion treatment of mangoes (*Mangifera indica*L.). *Food Chem.* 115: 989-993.
- [16] Mirdehghan S. D., Rahimi M., Serrano M., Guillen F., Martín-Romero D. and Valero D. 2006. Prestorage heat treatment to maintain nutritive and functional properties during postharvest cold storage of pomegranate. *J Agr food Chem.* 54: 8495-8500.
- [17] Schirra M., Angioni A., Cabras P., D'Aquino S. and Palma A. 2011. Effects of postharvest hot water and hot air treatments on storage decay and quality traits of Kumquat (*Fortunella japonica* Lour. Swingle, cv. Ovale) Fruit. *J Agri Sci Technol B:* 89- 94.
- [18] Palma A., D'Aquino S., Vanadia S., Angioni A. and Schirra M. 2013. Cold quarantine responses of 'Tarocco' oranges to short hot water and thiabendazole postharvest dip treatments. *Postharvest Biol Technol.* 78: 24-33.

**Tablas y Figuras**



**Figura 1.** Contenido en polifenoles totales en dátiles “Deglet-Noor” tratado o no con baños térmicos y conservado en atmósfera de aire 30 d a 2 °C. Media (n = 3) ± ES. El análisis de varianza mostró como factor significativo los baños térmicos siendo DMS  $t_{tratamiento}$  = 6,09.



**Figura 2.** Actividad antioxidante (FRAP) en dátiles “Deglet-Noor” tratado o no con baños térmicos y conservados en atmósfera de aire 30 d a 2 °C. Media (n = 3) ± ES. El análisis de varianza mostró como factor significativo: baños térmicos siendo DMS  $t_{tratamiento}$  = 3,65 y el tiempo de conservación DMS  $t_{tiempo}$  = 3,65.

**Tabla 1.** Contenido en azúcares totales (g/100g) de dátiles “Deglet-Noor” tratados o no con baños térmicos y conservados en atmósfera de aire 30 días a 2 °C.

Tiempo de conservación	Baños de agua	Azúcares totales (g/100g)
0 días	Testigo	57,55
	50 °C 10 min	50,05
	55 °C 5 min	51,96
	60 °C 3 min	47,85
30 días	Testigo	51,43
	50 °C 10 min	48,82
	55 °C 5 min	52,78
	60 °C 3 min	52,68
TC		NS
Baños		(3,37)
TCxBaños		NS

Media (n = 3) ± ES. El análisis de varianza mostró como factor significativo los baños térmicos siendo DMS  $t_{tratamiento}$  = 3,37.

## Agrupamiento jerárquico de compuestos individuales de aroma en melón "Piel de Sapo" y la línea casi isogénica SC3-5-1

L.A. Chaparro- Torres, J.P.Fernández-Trujillo

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

### RESUMEN

El melón (*Cucumis melo* L.), se ha convertido en un sistema modelo debido a que presenta cultivares con comportamiento fisiológico climatérico o no climatérico, lo que lo hace ideal para estudios genéticos relacionados con calidad de fruto. Este trabajo busca encontrar los aromas diferenciales de un parental no climatérico tipo "Piel de sapo" –PS- y la línea casi isogénica climatérica SC3-5-1, así como su agrupamiento en clústers mediante un análisis jerárquico. El método de cromatografía de gases-masas tras micro-extracción de la fase sólida en espacio de cabeza identificó en zumo de melón un total de 129 y 111 compuestos volátiles individuales en dos campañas sucesivas, la mayoría de ellos ésteres acetato o no acetato, aldehídos, alcoholes, y derivados azufrados. Un total de 56 compuestos volátiles individuales diferenciaron a la línea casi isogénica SC3-5-1 de su parental 'Piel de Sapo'. Tras el análisis jerárquico de los aromas se localizaron un total de 5 y 4 clústers para la primera y segunda campaña, respectivamente, con una agrupación jerárquica asociada a la correlación que presentan los compuestos característicos y diferenciadores de SC3-5-1 y el parental PS para cada año, que parecen ser éster acetato o no acetato derivados de distintos amino ácidos y ésteres azufrados con metionina de precursor (predominantes en la línea climatérica) y aldehídos simples C7 -C9 y otros (para la no climatérica).

**Palabras clave:** Aromas volátiles; clúster, calidad de fruto; climaterio; cromatografía de gases-masas; *Cucumis melo* L.

### 1. Introducción

El melón se ha convertido en un fruto modelo de interés y está siendo objeto de investigación debido al fenotipo climatérico y no-climatérico que presenta. Esta característica ayuda a conocer las diferencias moleculares responsables de las diferencias en la maduración regulada por la síntesis de etileno, la cual provoca cambios en el aroma del melón (1)

El aroma del melón se caracteriza por el equilibrio de los compuestos volátiles que están determinados por combinaciones únicas y complejas determinantes en la calidad del melón (2). Los análisis de compuestos aromáticos en diferentes variedades de melón son estudiados en variedades climatéricas en las cuales se ha detectado el predominio de ésteres (1; 2), derivados de azufrados (3), sesquiterpenos, norisoprenoides, aldehídos y alcoholes (1). En variedades no climatéricas se reportan presencias de niveles bajos de volátiles totales, en su mayoría conformados por compuestos saturados, no saturados (alcoholes y aldehídos de C9) y ésteres generalmente a niveles bajos o ausentes (1; 4).

Actualmente estas combinaciones únicas se están estudiando mediante el uso de diseños estadísticos con un enfoque reduccionista (5; 6). Este análisis reduccionista se representa mediante dendogramas de agrupamiento jerárquico (HCA). Estos análisis se basan en correlaciones entre mediciones cuantitativas las cuales es posible representarlás usando mapa de calor (6).

Estos estudios reduccionistas se emplean como parte del análisis de su calidad y para estudios de las interacciones metabólicas del fruto (5; 7).

En este estudio se ha empleado un método reduccionista para el análisis de los resultados de compuestos volátiles obtenidos de un análisis comparativo de aromas entre una línea casi isogénica climatérica y su parental control no climatérico. El objetivo es agruparlos en clúster y de este modo poder seleccionar los más representativos de cada grupo o una característica común definitoria de cada grupo para análisis estadísticos posteriores.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. Material vegetal

Se obtuvieron frutos de melón (*Cucumis melo* L.) del cultivar español T111 del tipo 'Piel de Sapo' y grupo *Inodorus* (PS), con comportamiento no climatérico, y de la línea casi isogénica (NIL) SC3-5-1 con comportamiento climatérico (8; 9). El número de réplicas evaluadas (n, datos respectivos para cada campaña) fueron n=8; 9 (NIL SC3-5-1) o n= 21; 13 (parental PS). El cultivo y la recolección se realizaron en el Centro de Investigación y Experiencias Agrarias CIFEA (Torre Pacheco, Murcia) y los frutos se recolectaron según los índices de madurez descritos previamente Obando-Ulloa et al. (1).

### 2.2. Preparación de la muestra y condiciones de HP-SPME/GC-MS

Las muestras de zumo de melón para el análisis de aromas se obtuvieron de pulpa extraída en cilindros de los frutos. Se preparó una mezcla de zumo filtrado para análisis con de 28.5% de solución saturada de cloruro cálcico, para posteriormente realizar la extracción de volátiles mediante micro extracción de fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME), según el protocolo de Obando-Ulloa et al. (1). Las muestras gaseosas se analizaron mediante un cromatografo de gases 6890 acoplado al espectrómetro de masas 5975 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) según el método de análisis descrito en Dos-Santos et al. (4). En total se integraron 104 cromatogramas. La identificación de los compuestos se realizó mediante comparación con la librería de espectros del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST05a.L) de EEUU y se validaron mediante el cálculo del índice de retención lineal (LRI) inyectando una serie de *n*-alcanos (C6-C20) con el mismo método de análisis. Los compuestos identificados se clasificaron en grupos de compuestos químicos volátiles del tipo éster acetato o no acetato, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos, derivados azufrados, compuestos alifáticos hidrocarbonados, terpenos, otros, no identificados cuando la comparación de espectros no coincidía, o compuestos contaminantes o no típicos de melón.

### 2.3. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se seleccionaron los compuestos volátiles individuales con una presencia mayor al 25% en frutos y mayor al 50% del total de replicas evaluadas. Para identificar los compuestos volátiles responsables de la discriminación, se realizaron pruebas de análisis

multivariado de como el análisis discriminante parcial de mínimos cuadrados (PLS-DA) y *árboles de decisión aleatorios* (datos no mostrados) (1; 4). Los compuestos individuales obtenidos en cada año se sometieron a un análisis de agrupación jerárquica (HCA) empleando el coeficiente de correlación de Pearson. Se representaron en conjunto usando mapa de calor (*heatmap*) con el fin de asociar la jerarquía de los compuestos volátiles del fruto del melón y obtener los grupos de compuestos o clúster. En cada agrupamiento jerárquico se analizaron las características de los compuestos por su estructura química y ruta biosintética.

## Resultados y Discusión

Se identificaron 129 compuestos volátiles individuales en la primera campaña y 111 en la segunda.

En la primera campaña se identificó un clúster denominado C de compuestos volátiles del tipo aldehídos derivados de ácidos grasos como nonanal, decanal, octanal, heptanal, (Z)-non-6-enal, (E)-hex-2-enal, (E)-pent-2-enal (Fig. 1, S1). Para la segunda campaña el clúster c englobó entre los aldehídos los 4 primeros citados anteriormente (Fig. 1, S2; Tabla 1) Este tipo de agrupamiento jerárquico de aldehídos presentó una correlación intermedia en ambas campañas comprada con los otros grupos de compuestos altamente correlacionados (Fig. 1 clúster c de S1 y S2). El motivo de identificar más aldehídos en la primera que en la segunda campaña pueden estar relacionado con las mejores condiciones ambientales para el cultivo del melón en la segunda campaña (4).

Los compuestos que presentaron una alta correlación se agruparon en el clúster E o d (Fig.1, S1-S2), en el que se identificaron compuestos de tipo éster acetato o no acetato derivados de distintos amino ácidos y compuestos azufrados como: metil 2-metilsulfanilacetato, 3-metilsulfanilpropil acetato, S-metil butanetioato, S-metil 3-methylbutanetioato, S-metil propanetioato, etil 3-metilsulfanilpropanoato, que son ésteres derivados del aminoácido metionina asociado a la biosíntesis de etileno del fruto (3), aunque alguno podría proceder de la cisteína.

En general, los compuestos volátiles discriminantes de climaterio debido a una mayor o única presencia en la NIL SC3-5-1 se identificaron en la zona de mayor intensidad en el mapa de calor (Fig. 1).

### 3. Conclusiones

Un total de 129 compuestos volátiles individuales se obtuvieron en la primera campaña mientras 111 en la segunda campaña. Los resultados de la jerarquización de los volátiles individuales En los dendogramas del HCA indicaron una fuerte correlación de los compuestos discriminantes característicos de la NIL climatérica SC3-5-1 o para PS en las dos campañas evaluadas.

### 4. Agradecimientos

A Plácido Varó y su equipo (CIFEATorrepacheco) por su manejo del cultivo. A la Dra. María José Roca (SAITUPCT) por su asistencia técnica en la cromatografía de gases-masas. Al Instituto de Investigación y Tecnologías Agroalimentarias –Centro de Investigación en Agrigenómica (IRTA-CRAG) de Barcelona por el suministro de semillas. A UE-FEDER y MINECO (proyecto AGL2010-20858) y Fundación Séneca de la Región de Murcia (proyecto 11784/PI/09) por el soporte financiero.

### 5. Referencias bibliográficas

[1] Obando-Ulloa, J.M., Moreno, E., García-Mas, J., Nicolai, B., Lammertyn, J., Monforte, A.J., Fernández-Trujillo, J.P. 2008. Climacteric or non-climacteric behavior in melon fruit: 1. Aroma volátiles. *Postharvest Biol. Technol.* 49: 27-37.

[2] Beaulieu, J.C., Grimm, C.C.. 2001. Identification of volatile compounds in cantaloupe at various developmental stages using solid phase microextraction. *J Agric. Food Chem.* 49: 1345-1352.

[3] Gonda, I., Lev, S., Bar, E., Sikron, N., Portnoy, V., Davidovich-Rikanati, R., Burger, J., Schaffer, A.A., Tadmor, Y., Giovannonni, J.J. 2013. Catabolism of L-methionine in the

formation of sulfur and other volatiles in melon (*Cucumis melo* L.) fruit. *Plant J.* 74: 458-472.

[4] 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.

[5] Carli, P., Arima, S., Fogliano, V., Tardella, L., Frusciante, L., Ercolano, M.R. 2009. Use of network analysis to capture key traits affecting tomato organoleptic quality. *J. Expt. Bot.* 60: 3379-3386.

[6] Stone, E.A. Ayroles, J.F., 2009. Modulated modularity clustering as an exploratory tool for functional genomic inference. *Plos Genet.* 5: e1000479.

[7] Bernillon, S., Biais, B., Deborde, C., Maucourt, M., Cabasson, C., Gibon, Y., Hansen, T.H., Husted, S., De Vos, R.C.H., Mumm, R., Jonker, H., Ward, J.L., Miller, S.J., Baker, J.M., Burger, J., Tadmor, Y., Beale, M.H., Schjoerring, J.K., Schaffer, A.A., Rolin, D., Hall, R.D., Moing, A. 2013. Metabolomic and elemental profiling of melon fruit quality as affected by genotype and environment. *Metabolomics* 9: 57-77.

[8] Vegas, J., Garcia-Mas, J., and Monforte, A. J. 2013. Interaction between QTLs induces an advance in ethylene biosynthesis during melon fruit ripening. *Theor. Appl. Genet.* 126: 1531-1544.

[9] Eduardo, I., Arús, P., Monforte, A.J., Obando, J., Fernández-Trujillo, J.P., Martínez, J. A., Alarcón, A.L., Álvarez, J. M., van der Knaap, E. 2007. Estimating the genetic architecture of fruit quality traits in melon using a genomic library of near isogenic lines. *J Amer. Soc. Hort. Sci.* 132: 80-89.

**Tabla y Figuras**

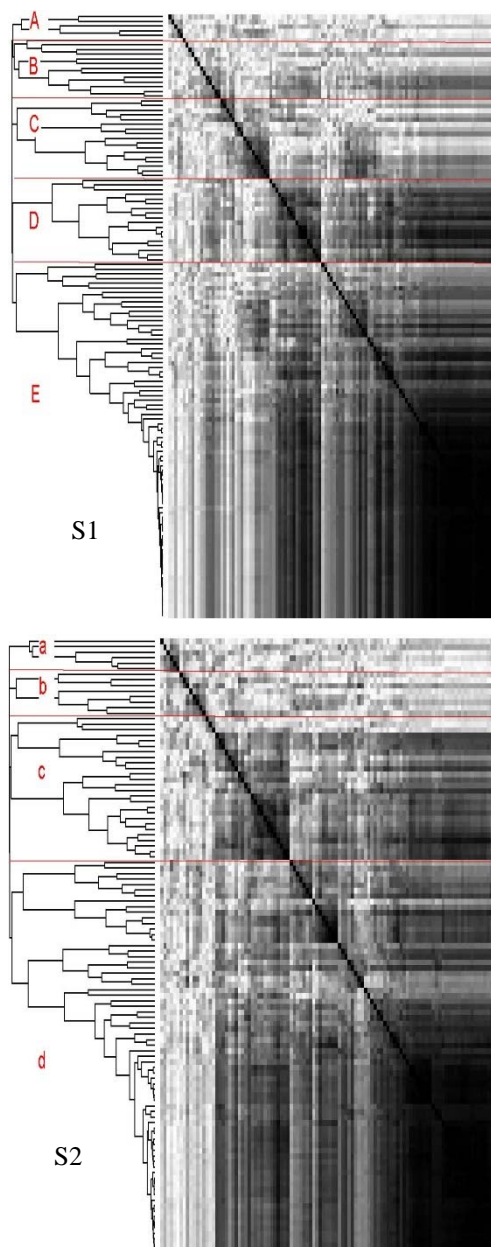
**Tabla 1.** Número de compuestos volátiles que conforman cada grupo en el agrupamiento jerárquico (HCA) de los aromas volátiles del parental Piel de Sapo y la NIL SC3-5-1.

	Clúster <sup>1</sup>	Grupo clasificación <sup>2</sup>
<b>Campana 1</b>	A	ALD; KET; NAE; ALC (2*).
	B	AHA; ALC (2); ALD (2); KET (4); SDC (2).
	C	ACL; ALD (11); KET (2); NAE.
	D	ACE (4); AHA (2); ALC; NAE (7); SDC (2).
	E	ACE (23); AHA (2); ACL (9); ALD (7); KET (3); NAE (11); SDC (9).
<b>Campana 2</b>	A	SDC (2); ALC (3)
	B	NAE, ALC (4), ALD
	C	ALC, ALD (6), KET (2), NAE (5); ACE (4)
	D	ACE (21), AHA (4), ALC (6), ALD (6); KET (5); NAE (12), SDC (9)

<sup>1</sup>. Grupos de compuestos individuales en base al coeficiente de correlación de Pearson.

<sup>2</sup>. Grupo de clasificación: ALD, aldehído; KET, cetona; NAE, éster no acetato; ALC, alcohol; AHA, alcano o hidrocarburo alifático; ACE, éster acetato; SDC, derivado azufrado.

\*Número de compuestos individuales que pertenecen al mismo grupo de clasificación.



**Figura 1.** Dendrograma y mapa de calor del análisis de agrupamiento jerárquico (HCA) en base al coeficiente de correlación de Pearson obtenidos de los aromas volátiles individuales del parental Piel de Sapo y la línea casi isogénica SC3-5-1. S1 y S2 indican las dos campañas consecutivas de análisis.

Las letras A; a – E;d , indican los cluster seleccionados del HCA. El mapa de calor a mayor intensidad del color mayores la correlación.

## La combinación del riego deficitario y técnicas de curado mejoran la calidad de la nectarina extratemprana

N. Falagán<sup>(1,2)</sup>, F. Artés<sup>(1,2)</sup>, P.A. Gómez<sup>(3)</sup>, F. Artés-Hernández<sup>(1,2)</sup>, J.M. de la Rosa<sup>(4)</sup>, E. Aguayo<sup>(1,2)</sup>

<sup>(1)</sup> Unidad Calidad Alimentaria y Salud. Instituto de Biotecnología Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). Campus Muralla del Mar. 30202 Cartagena, España. natalia.falagan@upct.es

<sup>(2)</sup> Grupo de Postrecolección y Refrigeración. Dpto. Ingeniería de Alimentos. ETSIA-UPCT. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena, España. Tel.: +34 968 325750

<sup>(3)</sup> Instituto de Biotecnología Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). Campus Muralla del Mar. 30202 Cartagena, España

<sup>(4)</sup> Grupo de 'Suelo-Agua-Planta'. Dpto. de Producción Vegetal. ETSIA-UPCT.

### RESUMEN

Las zonas mediterráneas se caracterizan por su escasez de agua y la poca calidad de la misma. Tienen una importante producción de fruta de hueso, en régimen de regadío. Para mejorar el uso de este recurso, es conveniente recurrir a estrategias de riego deficitario controlado (RDC) que optimicen su uso agrícola y preserven la calidad de los productos obtenidos. Este trabajo estudia cómo afecta el estrés hídrico a la calidad de la nectarina extratemprana "Viowhite 5", sujeta a dos estrategias de RDC diferentes, respecto a un testigo regado al 100% de su evapotranspiración. Además, en los frutos recolectados, se estudió la implementación de la técnica de curado como una herramienta para mejorar su calidad organoléptica. La nectarina se conservó durante 10 días a 0°C seguidos de un periodo de comercialización en aire de 3 días a 15°C. Las nectarinas sometidas a estrés hídrico combinado con un curado postcosecha presentaron un contenido inicial de SST mayor que los testigos aunque no hubo diferencias significativas en las evaluaciones posteriores. El curado incrementó las pérdidas de peso. Respecto a la firmeza, inicialmente y tras el periodo de refrigeración las nectarinas presentaban valores muy altos (35 a 32 N) sin diferencias entre tratamientos. Sin embargo, tras la comercialización, los frutos sometidos a curado redujeron su firmeza hasta un rango óptimo para el consumo. Durante todo el periodo postcosecha no se registraron daños por frío. Como principal conclusión, el RDC combinado con curado proporcionó nectarinas con una calidad organoléptica superior a los testigos, sin afectar negativamente otros parámetros físico-químicos y permitiendo un gran ahorro de agua.

**Palabras clave:** estrés; daños por frío; firmeza; evaluación sensorial.

### 1. Introducción

El cultivo de fruta de hueso en zonas mediterráneas se realiza en régimen de regadío, lo que supone un alto consumo de agua ( $\approx 7.000 \text{ m}^3/\text{ha}\cdot\text{año}$ ). Su productividad es muy alta pero el factor limitante es la aridez de la zona y la baja calidad de los recursos hídricos, base del sistema. Por ello, se desarrollan estrategias de riego deficitario controlado (RDC), que permitan reducir el consumo hídrico del cultivo sin mermar la producción y calidad de la cosecha. Se ha demostrado en melocotón, almendra y cítricos [1,2] que una reducción del riego en ciertas etapas del cultivo, no deteriora la calidad del fruto. Para este trabajo se ha seleccionado la nectarina (*Prunus persica* var. Nectarina) extratemprana "Viowhite 5" con elevado valor comercial y calibre óptimo para el mercado

europeo. La aplicación de RDC tiene mayor interés en variedades extratempranas ya que sus máximas necesidades de riego se concentran en periodos de relativamente baja demanda evaporativa. Esta variedad se caracteriza por su temprana floración (febrero) y recolección (mediados de abril). Como inconveniente presenta relativamente bajos sólidos solubles totales (SST), lo cual reduce su aceptación en algunos mercados. Por ello se buscan tratamientos postcosecha que mejoren sus cualidades organolépticas, con el fin de satisfacer la exigencia de los consumidores. Entre ellos se encuentra el "curado" o "curing", consistente en exponer el producto a temperaturas moderadamente altas durante un cierto tiempo, con el fin de mejorar el color, firmeza, SST o reducir la acidez. Además, se ha demostrado que contribuye al control de *Monilinia* spp. [3].

Por todo lo expuesto, el objetivo de este trabajo consistió en estudiar la influencia del RDC y la técnica de “curado” en la calidad global de nectarina, conservada 10 días a 0°C seguida de un periodo de 3 días a 15°C.

## 2. Materiales y Métodos

El cultivo de nectarina “Viowhite 5” se realizó en una parcela en plena producción sita en Molina de Segura (Murcia). Se aplicaron tres tratamientos de riego: testigo, regado al 100% de la evapotranspiración (ETc) y dos estrategias de RDC: RDC<sub>1</sub> y RDC<sub>2</sub> (riego durante todo el ciclo como el testigo excepto el período postcosecha, donde fue de un 84 y 60% del testigo, respectivamente). Los frutos de cada tratamiento se trasladaron a la Planta Piloto del Grupo de Postrecolección y Refrigeración, separando cada tratamiento de riego en dos grupos: el primero, se expuso durante 2 h a 50°C y el segundo se mantuvo a 45°C durante 3 h. A continuación, se almacenaron 10 días a 0°C y 95% HR, seguidos de un periodo de comercialización de 3 días a 15°C. En los días 0 (inicial), 10 (fin de conservación) y 10+3 (fin de comercialización) se determinaron los siguientes parámetros:

### 2.1 Pérdida de peso

Se pesaron 30 frutos de cada tratamiento en el día inicial, tras la conservación refrigerada y al final de la comercialización, expresando las diferencias en porcentaje.

### 2.2 Firmeza

En dos puntos de la zona ecuatorial del fruto se midió la resistencia que ofrecía a la penetración de una probeta en 10 mm de profundidad (50 mm/min y 8 mm de diámetro) (ELIB-5K S.A.E. Ibertest, Daganzo de Arriba, Madrid, España).

### 2.3 Atributos químicos

En zumo extraído (Moulinex, Barcelona, España) de frutos de cada tratamiento se analizaron los SST con un refractómetro (Atago N1, Tokio, Japón), pH (pH-metro Basic 20 Crison, Barcelona, España) y acidez titulable (AT) con un titulador automático (Metrohm716, DMS Titrino, Suiza).

### 2.4 Análisis sensorial

Un panel entrenado de 5 personas (3 mujeres y 2 hombres, entre 25 y 65 años) utilizó una escala hedónica de 9 puntos para evaluar la apariencia,

olor, sabor y textura: 1 extremadamente malo o, en la textura, muy blanda; 3, me disgusta o textura blanda; 5, ni me gusta ni disgusta o moderada textura (límite de comercialización); 7, me gusta o buena textura y 9, excelente textura.

### 2.5 Daños por frío y podredumbres

Se comprobó el desarrollo de daños por frío y podredumbres, evaluando la intensidad y área de afección.

### 2.6 Análisis estadístico

En cada lote se calculó la media aritmética y su error estándar (ES).

## 3. Resultados y Discusión

### 3.1 Pérdida de peso

Las pérdidas de peso obtenidas en los tratamientos de RDC fueron similares al tratamiento regado al 100% de su ETc tras la comercialización (3,60 ± 0,20 %). Sin embargo, el curado incrementó las pérdidas de peso frente al testigo no curado (1,97 ± 0,27 vs 3,11 ± 0,31 %), observándose una tendencia creciente con el tiempo (datos no mostrados).

### 3.2 Firmeza

La firmeza es un parámetro que influye considerablemente en la aceptación del consumidor. En el día 0 y tras la conservación refrigerada, las nectarinas presentaban unos valores muy altos de firmeza (35 a 32 N). Tras la comercialización, el curado redujo la firmeza de la nectarina, en particular en el testigo y el RDC<sub>1</sub> (Fig. 1), obteniéndose valores óptimos para comercializar, considerados entre 13,5 y 9 N [5].

### 3.3 Atributos químicos

Respecto a los SST, los frutos sometidos a RDC y curado mostraron un mayor contenido inicial que las nectarinas testigo (9,43 ± 0,14 °Brix vs. 10,30 ± 0,13 y 10,20 ± 0,20 °Brix, para los frutos expuestos a 2h 50°C y 3h 45°C, respectivamente). Esta diferencia inicial fue disminuyendo con el tiempo de conservación, sin diferencias entre tratamientos al final del experimento (Fig. 2). Estos resultados coinciden parcialmente con otros investigadores quienes no encontraron diferencias significativas en este parámetro con el uso único del curado aplicado en nectarinas “Elegant lady” y “Fantasía” [3].



Según nuestros resultados, la combinación del RDC con el curado proporcionó nectarinas con un contenido inicial en SST próximo a los 11 °Brix, valor recomendable de consumo según Crisosto et al. [7]. Conforme a lo esperado, la AT siguió una tendencia decreciente y contraria a los valores registrados de pH. Inicialmente, los frutos sometidos a RDC y curado presentaron una menor AT que las nectarinas testigo, homogeneizándose los valores al finalizar la conservación (datos no mostrados). Este comportamiento refleja el consumo de ácidos orgánicos como sustrato respiratorio de las nectarinas [8,9] (Datos no mostrados).

### 3.4 Análisis sensorial

La calificación global obtenida por las nectarinas sometidas a RDC y curado fue superior a los testigos, principalmente por la mejor valoración obtenida en sabor (mayores SST), aroma y textura (datos no mostrados).

### 3.5 Daños por frío y podredumbres

Durante la conservación y comercialización, no se desarrollaron daños por frío en ninguno de los tratamientos. Tras la comercialización se observaron inicios de desarrollo de podredumbres en la zona apical, en mayor medida en los tratamientos sometidos a curado pero sin afectar la calidad global del producto (datos no mostrados). Las condiciones estudiadas tanto de conservación como duración y temperatura, impidieron que la afección evolucionara, manteniéndose por debajo del periodo de latencia [10].

## 4. Conclusiones

La combinación del RDC con la técnica de curado mejoró la calidad organoléptica de la nectarina extratemprana "Viowhite 5", además de permitir con este tipo de estrategias de riego el ahorro de importantes cantidades de agua.

## 5. Agradecimientos

Se agradece al Ministerio de Ciencia e Innovación-FEDER la financiación (proyecto AGL2010-19201-C04-02-AGR) y la beca predoctoral de N. Falagán, y al Instituto de

Biotecnología Vegetal de la UPCT la utilización de algunos equipos.

## 6. Referencias bibliográficas

- [1] González-Altozano P., Castel J.R. 1999. Regulated deficit irrigation in 'Clementina de Nules' citrus trees. I. Yield and fruit quality effects. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 74: 706–713.
- [2] Mitchell, P.D., Chalmers, D.J. 1982. The effect of reduced water supply on peach tree growth and yields. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 107: 853–856.
- [3] Casals, C., Teixidó, N., Viñas, I., Llauradó, S., Usall, J. 2009. Control of *Monilinia* spp. on stone fruit by curing treatments. *Postharvest Biol. Technol.* 56: 19-25.
- [4] Pérez-Pastor, A., Ruiz-Sánchez, M.C., Martínez, J.A., Nortes, P.A., Artés, F., Domingo, R. 2009. Effect of deficit irrigation on apricot fruit quality at harvest and during storage, *J. Sci. Food Agric.* 87: 2409-2415.
- [6] Crisosto, C.H. 1994. Stone fruit maturity indices: a descriptive review, *Postharvest News and Information.* 5: 65-68.
- [7] Crisosto, C.H., Johnson, R.S., Luza, J.G., Crisosto, G.M. 1994. Irrigation regimes affect fruit soluble solids concentration and rate of water loss of 'O'Henry' peaches, *Hort. Sci.* 29: 1169-1171.
- [8] Artés, F., Salmerón, M.C. 1996. Quality attributes pectolytic enzyme activities and physiological changes during postharvest ripening of nectarine, *J. Food Qual.* 19: 491-503.
- [9] Mpelasoka, B.S., Behboudian, M.H., Mills, T.M. 2001. Effects of deficit irrigation on fruit maturity and quality of 'Braeburn' apple, *Sci. Hortic.* 90: 279-290.
- [10] Artés, F., Fernández-Trujillo, J.P. 1999. Recent studies on postharvest behaviour of peaches. *Res. Develop. Agric. Food Chem.* 3: 471-487.

Figuras

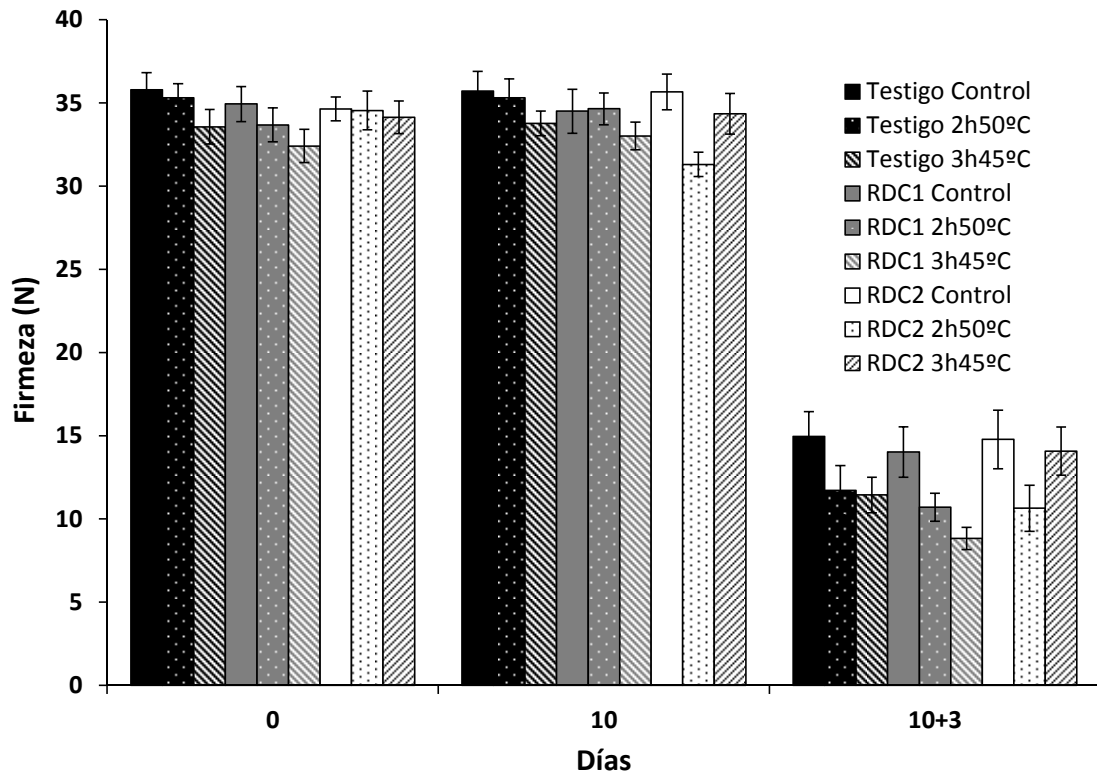


Figura 1. Evolución de la firmeza de la nectarina “Viowhite 5” sometida a RDC y técnicas de curado. Las barras verticales indican el error estándar ( $n = 18 \pm ES$ ).

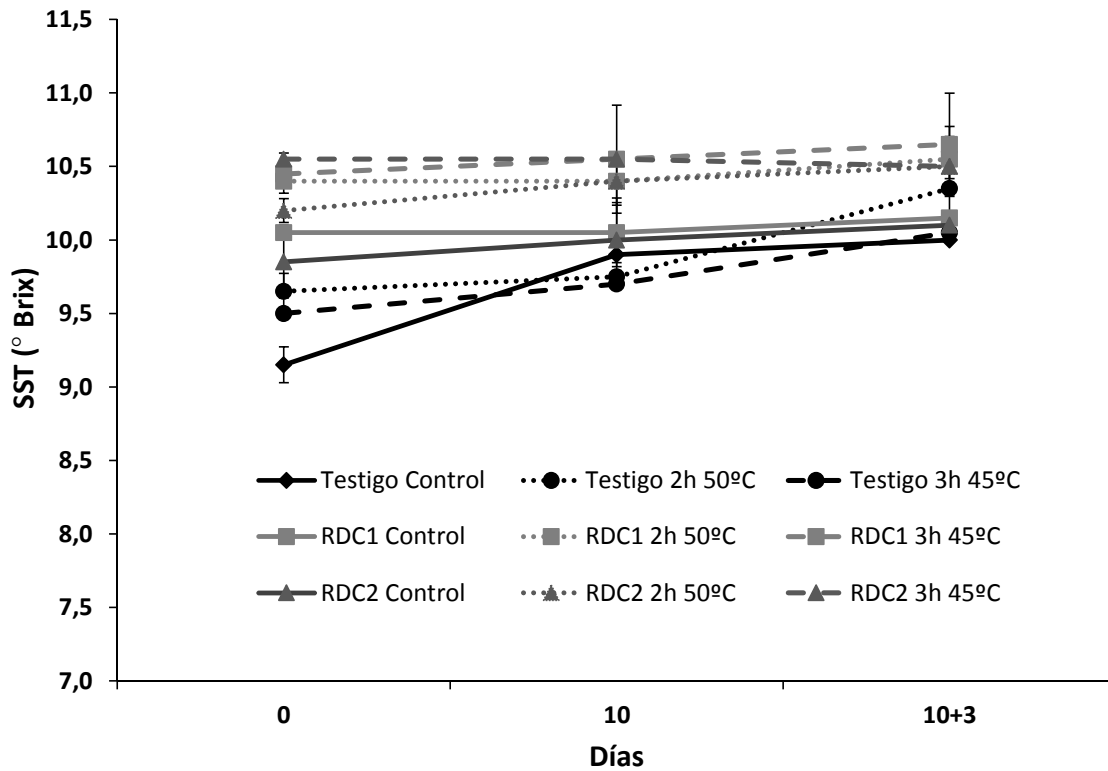


Figura 2. Evolución del contenido en SST de la nectarina “Viowhite 5” sometida a RDC y técnicas de curado. Las barras verticales indican el error estándar ( $n = 3 \pm ES$ ).

## Evolución del contenido en vitamina C en brócoli mínimamente procesado en fresco desinfectado con agua electrolizada y con recubrimientos comestibles

J. Navarro-Rico<sup>(1)</sup>, G.B. Martínez-Hernández<sup>(2)</sup>, P.A Gómez<sup>(2)</sup>, M. Otón<sup>(2)</sup>, F. Artés<sup>(1,2)</sup>, F. Artés-Hernández<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Grupo de Postrecolección y Refrigeración. Departamento de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola. Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena, Murcia, España. javiernavarrico@gmail.com;

<sup>(2)</sup> Instituto de Biotecnología Vegetal. UPCT. Campus Muralla del Mar, Edificio I+D+I. 30202 Cartagena, Murcia, España.

### RESUMEN

Tradicionalmente, los recubrimientos comestibles se han empleado con el fin de retrasar la senescencia del producto vegetal, estableciendo una protección natural. En este trabajo, se estudió el efecto de la aplicación de dos recubrimientos comestibles sobre la calidad y el contenido de vitamina C durante la vida comercial de brócoli "Parthenon" mínimamente procesado en fresco. El broccoli fue desinfectado con agua electrolizada neutra (AEN) (ORP= 830 mV; 5 °C; pH=7; tiempo de contacto= 2 min). Posteriormente, se aplicaron dos recubrimientos comestibles: Naturcover® (5% de sucroesteres) y alginato de sodio (2 g/100 mL), empleando glicerol como plastificante (1,5 g/100 mL) y aceite de girasol como emulsionante. El producto fue almacenado bajo condiciones de atmosfera modificada (AM) durante 15 días a 5 °C. Brócoli lavado con agua corriente a 5°C fue considerado como testigo. Se estudió la calidad sensorial, la carga microbiana (mesófilos, enterobacterias y hongos y levaduras) y el contenido de vitamina C (ácido ascórbico y dehidroascórbico) de los floretes de brócoli 'Parthenon'. La AM de equilibrio se alcanzó a los 3-4 días de conservación y fue de 10-12 kPa CO<sub>2</sub> y 5-11 kPa O<sub>2</sub>. La carga microbiana para los tres tipos de microorganismos estudiados estuvo situada entre 4 y 7 UFC g<sup>-1</sup> durante el almacenamiento refrigerado. El contenido de vitamina C el día inicial varió entre los 914.74 mg/kg materia fresca del tratamiento NEW y los 555.96 del tratamiento testigo. Como conclusión principal, el brócoli 'Parthenon' MPF tratado con NEW y Naturcover® mostraron una mejor calidad durante la vida comercial conservando el contenido de vitamina C inicial.

**Palabras clave:** IV Gama, "Parthenon", conservación, ácido ascórbico, *Brassica oleracea* Grupo Itálica

### 1. Introducción

Los hábitos de vida saludables cada vez más instaurados en la población actual, han provocado un aumento progresivo de la demanda de productos frescos, de buena calidad y que estén listos para consumir como los productos mínimamente procesados en fresco (PMPF) [1]. Es esencial una desinfección eficaz de los PMPF para poder garantizar la seguridad alimentaria de los mismos, pues todas las operaciones que se realizan durante el procesado provocan un aumento de la carga microbiana de los productos. Diversos estudios han mostrado al agua electrolizada neutra (AEN), como un desinfectante barato, eficaz y con resultados similares a los presentados por el hipoclorito sódico [2], desinfectante ampliamente utilizado por las industrias de PMPF y que ha sido prohibido en distintos países europeos debido a

que su empleo favorece la formación de compuestos potencialmente perjudiciales para el ser humano y el medio ambiente [3]. Los recubrimientos comestibles se emplean ampliamente en las industrias de la IV Gama de la alimentación ya que proveen al producto de una protección natural que retrasa su senescencia y le permite mantener una calidad óptima durante un mayor periodo de tiempo. El brócoli presenta gran cantidad de compuestos bioactivos en su composición, como la vitaminas C y E, flavonoles, carotenoides y los glucosinolatos [4].

En este trabajo se realizó un estudio sobre el efecto de una desinfección con AEN y la posterior aplicación de dos recubrimientos comestibles sobre la calidad durante la vida útil y el contenido de vitamina C de brócoli "Parthenon" MPF.

## 2. Materiales y Métodos

El brócoli 'Parthenon' fue proporcionado por la Cooperativa Agrícola de Producción Sacoje (La Hoya, Lorca, Murcia). Una vez recolectado, el producto fue trasladado con hielo picado en la superficie a la planta piloto del Grupo de Postrecolección y Refrigeración de la Universidad Politécnica de Cartagena y almacenado a 0°C en condiciones de oscuridad hasta el momento del procesado. El material vegetal fue seleccionado en un estado de madurez uniforme y desprovisto de hojas. Las cabezas de "Parthenon" se cortaron con un cuchillo afilado, dejando sólo los floretes.

Los tratamientos aplicados fueron los siguientes: **TESTIGO:** El brócoli fue lavado (2 min) con agua corriente (5 °C); **NEW:** El brócoli fue desinfectado con AEN (100 ppm Cl<sub>2</sub> libre; pH: 7; 5°C; ORP: 830 mV) durante 2 min, seguido de un enjuagado (1 min) con agua corriente (5°C); **NATURCOVER:** desinfección del mismo modo que en el tratamiento NEW, seguido de la aplicación del recubrimiento comestible comercial Naturcover® (5% sucroesteres) (Decco, Valencia, España) durante 1 min, seguido de un secado de 1 min; **ALGINATO DE SODIO:** desinfección del mismo modo que en el tratamiento NEW, seguida de la aplicación de un recubrimiento comestible elaborado a partir de alginato de sodio (2 g/ 100 mL) + glicerol (1.5 g / 100 mL), aplicando aceite de girasol como emulsionante, durante 1 min, seguido de un secado de 1 min.

Una vez aplicados los tratamientos, 200 g de brócoli se situaron en barquetas de polipropileno rígido (PP) de 2 L de capacidad. Las barquetas se termosellaron con film de PP biorientado de 30 µm de espesor. Una vez envasado, se conservaron a 5°C en oscuridad. Los análisis se llevaron a cabo el día de procesado y en los días 5, 9 y 15 de conservación del producto.

### 2.1 Composición atmosférica en el interior de los envases

Las presiones parciales de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en el interior de los envases se midieron según los análisis realizados por Martínez-Hernández et al. [5].

### 2.2 Análisis microbiológicos

Se elaboraron conteos microbianos mediante métodos estándares realizados anteriormente por Martínez-Hernández [5] para aerobios mesófilos totales (AMT), enterobacterias (E) y hongos y levaduras (HL). La carga microbiana se expresó como logaritmo de unidades formadoras de colonia por gramo (log UFC g<sup>-1</sup>).

### 2.3 Evaluación sensorial

El panel consistía en 5 individuos previamente entrenados de entre 22-67 años. La escala y el procedimiento para el análisis sensorial se realizó de acuerdo a los trabajos previos elaborados por Martínez-Hernández et al. [5].

### 2.4 Contenido de vitamina C

Los análisis de ácido ascórbico (AA) y dehidroascórbico (ADHA) se elaboraron según el método llevado a cabo por Zapata y Dofour [6] con ligeras modificaciones introducidas por Martínez-Hernández et al. [7].

## 3. Resultados y Discusión

### 3.1 Composición atmosférica en el interior de los envases

No se apreciaron diferencias entre los distintos tratamientos para la concentración atmosférica en el interior de los envases (Fig 1). Las presiones parciales de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> en el equilibrio se alcanzaron el día 4 de conservación y hasta el día 15 se mantuvieron en valores de 10-12 kPa y 5-11 kPa, respectivamente. Estos valores son ligeramente inferiores para el CO<sub>2</sub> y superiores para el O<sub>2</sub> a los presentados por Martínez-Hernández et al. [5] para brócoli MPF.

### 3.2 Análisis microbiológicos

El día de procesado no se apreciaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos para los AMT, así, la carga microbiana inicial varió entre los 3,5 log UFC g<sup>-1</sup> del tratamiento CONTROL y los 3,1 log UFC g<sup>-1</sup> de los tratamientos NEW y NATURCOVER (Fig 2). Al final de la conservación, fueron estos dos tratamientos, NEW y NATURCOVER, los únicos que lograron mantener la carga de AMT por debajo de 5 log UFC g<sup>-1</sup>. Cabe destacar, el aumento de la carga microbiana de AMT que se produjo en el tratamiento ALGINATO, llegando a los 6,6 log UFC g<sup>-1</sup> (Fig 2) el último día de procesado, probablemente debido a la composición del recubrimiento, ya que se observó la misma tendencia tanto en la carga microbiana de E como en la de HL. La carga microbiana para las E el día de procesado se encuentra por debajo de los 3,5 log UFC g<sup>-1</sup> para todos los tratamientos, el último día de conservación la carga microbiana de E para CONTROL, NEW, NATURCOVER y ALGINATO había aumentado en un 47, 31,9, 31,8, y 67,9 % con respecto de la carga inicial, respectivamente. El máximo aumento vuelve a ser para el tratamiento ALGINATO. La carga microbiana de HL fue más elevada que la mostrada anteriormente para la misma variedad de brócoli por Martínez-Hernández [5], tanto en

el día de procesado como al final de la conservación, en la que no se encuentran diferencias entre los tratamientos aplicados.

### 3.3 Análisis sensorial

No se observaron diferencias en el día 5 de conservación entre los distintos tratamientos (datos no mostrados). En los días 9 y 15 de conservación los que mejores puntuaciones presentaron fueron NEW y NATURCOVER, mientras que TESTIGO y ALGINATO mostraron valores por debajo de los límites comerciales (datos no mostrados).

### 3.4 Contenido de vitamina C

El día de procesado los tratamientos CONTROL y ALGINATO con 166,1 y 175,7 mg/kg MF, respectivamente, presentaron mayores cantidades de AA que los tratamientos NEW y NATURCOVER, con 47,2 y 45,6 mg/kg MF.

En la Fig. 3 se observa como el TESTIGO presenta un contenido de ADHA de 389,8 mg/kg MF, significativamente menor, que los tratamientos NEW, NATURCOVER, ALGINATO, 867,5, 741,8, 677,9 mg/kg MF, respectivamente. Esta diferencia en el contenido de ADHA se puede deber al estrés sufrido por el brócoli durante la aplicación del tratamiento desinfectante así como de la aplicación de los recubrimientos comestibles.

Los valores de vitamina C total (AA+ADHA) (Fig. 3) en el día inicial varían de 555,9 mg/kg MF del tratamiento TESTIGO a los 914,7 mg/kg MF del tratamiento NEW, valores que están dentro del rango de 0,4-1,2 g/kg MF para variedades convencionales de brócoli [8,9]. Al final de la conservación, no se observaron diferencias; los valores de vitamina C total oscilaron entre 872,5 mg/kg MF de NEW y los 722,0 mg/kg MF de ALGINATO.

## 4. Conclusiones

La desinfección con AEN combinada con un envasado bajo AM resultó efectiva para mantener la calidad sensorial y microbiológica de brócoli 'Parthenon' MPF, así como el contenido de vitamina C total durante 15 días de conservación a una temperatura de 5°C.

A su vez, una desinfección con AEN combinada con la aplicación del recubrimiento comestible Naturcover® y envasado bajo AM resultó efectiva para mantener la calidad sensorial y microbiológica de brócoli 'Parthenon' MPF, así como el contenido de ácido ascórbico durante 15 días de conservación a una temperatura de 5°C.

## 5. Agradecimientos

Agradecer a la empresa Sakata SEEDS S.L.U. por la financiación necesaria para la elaboración de esta investigación, y a la Cooperativa Agrícola de Producción SACOJE por la donación del material vegetal.

## 6. Referencias bibliográficas

[1] Artés F., Gómez P., Aguayo E., Escalona V., y Artés-Hernández F. 2009. Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. *Postharvest Biology and Technology*, 51, 287-296.

[2] Navarro-Rico J., Artés-Hernández F., Gómez P., Nuñez-Sánchez M.A., Artés F., Martínez-Hernández G.B. 2014. Neutral and acidic electrolysed water microbial quality and health promoting compounds of fresh-cut broccoli throughout the shelf life. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 21, 74-81.

[3] Rico D., Martín-Diana A.B., Barry-Ryan C., Frías J.M., Henehan G.T.M., y Barat J.M. 2008. Use of neutral electrolysed water (EW) for quality maintenance and shelf-life extension of minimally processed lettuce. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 37-48.

[4] Podsedek A. 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: a review. *LWT-Food Science and Technology*, 40, 1-11.

[5] Martínez-Hernández G.B., Artés-Hernández F., Gómez P., Artés F. 2013. Comparative behaviour between kailan-hybrid and conventional fresh-cut broccoli throughout shelf-life. *LWT- Food Science and Technology*, 50, 298-305.

[6] Zapata, S., Dufour, J. P. 1992. Ascorbic, dehydroascorbic and isoascorbic and simultaneous determinations by reverse phase ion interaction HPLC. *Journal of Food Science*, 57, 506-511.

[7] Martínez-Hernández G.B., Artés-Hernández F., Gómez P., Artés F. 2013. Induced changes in bioactive compounds of kailan-hybrid broccoli after innovative processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 5, 133-143.

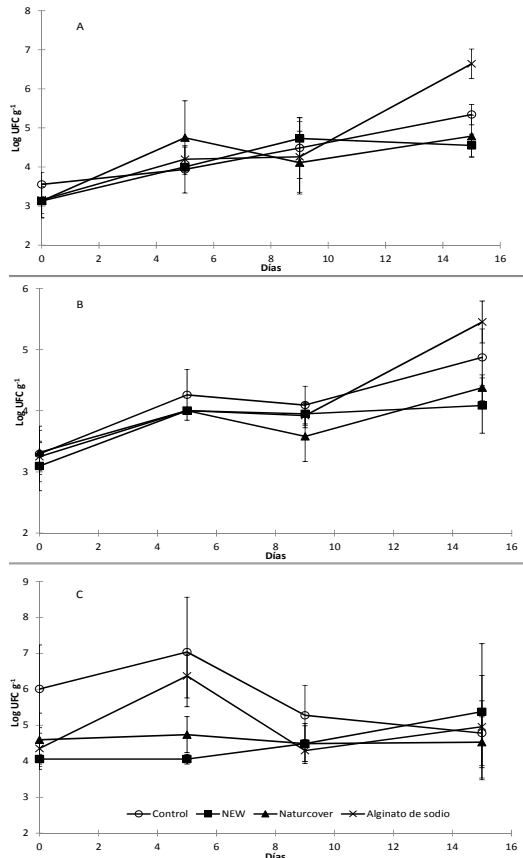
[8] Galgano, F., Favati, F., Caruso, M., Pietrafesa, A., & Natella, S. (2007). The influence of processing and preservation on the retention of health-promoting compounds in broccoli. *Journal of Food Science*, 72, 130-135.

[9] Munyaka, A. W., Oey, I., Van Loey, A., Hendrickx, M. 2010. Application of thermal

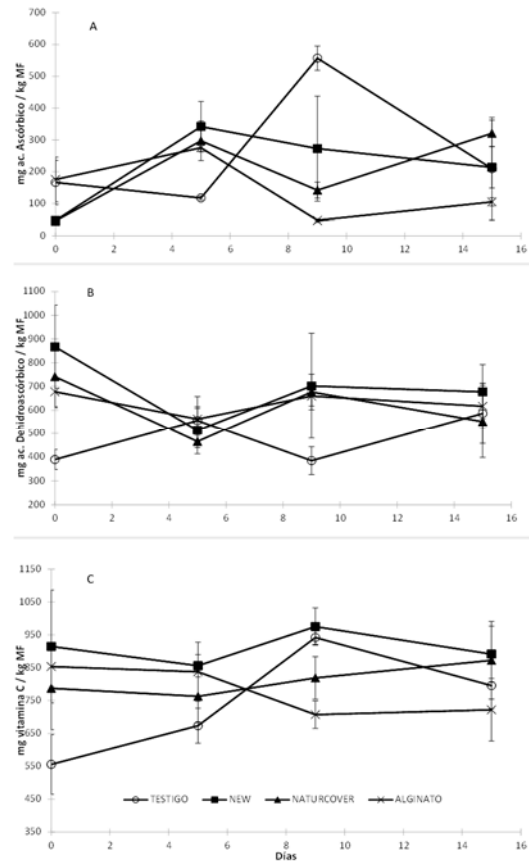
inactivation of enzymes during vitamin C analysis to study the influence of acidification, crushing and blanching on vitamin C stability in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*). *Food Chemistry*, 120, 591–598.

Levaduras (log UFC g<sup>-1</sup>) de brócoli 'Parthenon' MPF almacenado en condiciones de AM 15 días a 5°C.

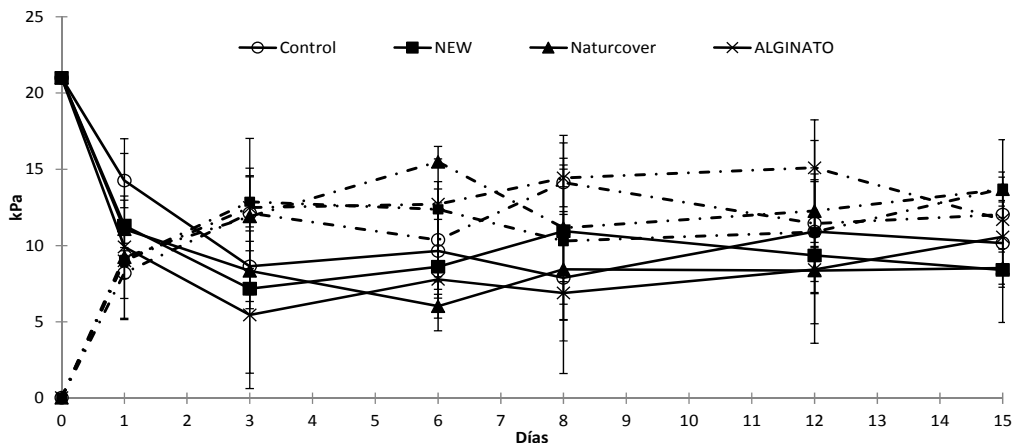
**Tablas y Figuras**



**Figura 2.** Cambios en (A) Aerobios Mesófilos Totales, (B) Enterobacterias, (C) Hongos y



**Figura 3.** Cambios en (A) Ácido ascórbico (mg AA/kg MF), (B) Ácido dehidroascórbico (mg ADHA/kg MF), (C) Vitamina C total (AA+ADHA) (mg/kg materia fresca) de brócoli 'Parthenon' MPF almacenado en condiciones de AM 15 días a 5°C.



**Figura 1.** Composición atmosférica [O<sub>2</sub> (-), CO<sub>2</sub> (-)] en el interior de los envases de brócoli 'Parthenon' MPF almacenado en condiciones de AM 15 días a 5°C.

## Efecto de la temperatura sobre la acumulación de carotenoides en frutos de tomate en diferentes estados de desarrollo

V. Hernández, P. Hellín, J. Fenoll, M.V. Molina, J. Cava, I. Garrido, P. Flores

Equipo de Calidad Alimentaria del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), 30150, Murcia. virginia.hernandez5@hotmail.com

### RESUMEN

El tomate es un fruto rico en carotenoides, principalmente licopeno, aunque también contiene concentraciones relativamente altas de  $\beta$ -caroteno, luteína, violaxantina y de los precursores fitoeno y fitoflueno, todos ellos con un importante efecto beneficioso para la salud. Su concentración en el fruto depende de diversos factores precosecha, entre los que destaca la temperatura ambiental, cuyo aumento por encima de 32 °C se ha correlacionado con una pérdida de calidad funcional en el tomate, consecuencia de la inhibición de la síntesis de licopeno. En este trabajo se estudió el efecto del incremento de la temperatura diaria (de 24 °C a 32 °C), impuesto en diferentes etapas de desarrollo del fruto (desde floración hasta fruto verde totalmente desarrollado), sobre la concentración final de carotenoides en el fruto maduro (rojo). Desde un punto de vista nutricional, el aumento de la temperatura a 32 °C en frutos totalmente desarrollados, provocó una pérdida de licopeno, fitoeno, fitoflueno, violaxantina y  $\gamma$ -caroteno. Sin embargo, cuando el incremento se impuso en estadios menos avanzados, las concentraciones de licopeno y fitoeno aumentaron, mientras que fitoflueno, luteína y  $\beta$ -caroteno no se vieron afectados.

**Palabras clave:** *Solanum lycopersicum*, calidad funcional, antioxidantes, bioactivos

### 1. Introducción

Además de su gran importancia socioeconómica, el tomate (*Solanum lycopersicum*) es considerado, desde un punto de vista nutricional, una potente fuente de vitaminas y compuestos bioactivos, lo que le ha permitido ser catalogado como alimento funcional [1]. En concreto, el tomate es rico en carotenoides, especialmente licopeno y  $\beta$ -caroteno (precursor vitamina A), principales pigmentos responsables de su color rojo característico y su poder antioxidante [2]. Además, el tomate es una fuente importante de otros carotenoides, entre ellos luteína, que juega un papel fundamental en la protección de la visión [3] y otros menos estudiados como los precursores fitoeno y fitoflueno, a los que se les atribuye un papel inhibidor en la progresión de la arterioesclerosis [4].

Las características organolépticas y la composición nutricional de los productos hortícolas vienen determinadas en gran medida por factores ambientales, entre los que destaca la temperatura [5]. El estudio de la influencia de las altas temperaturas sobre la composición de las hortalizas tiene especial relevancia en zonas

cálidas y en cultivos bajo invernadero, donde el incremento de temperatura es muy notable, sobre todo en los meses de verano. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del incremento de la temperatura diaria, impuesto en diferentes etapas de desarrollo del fruto, sobre la acumulación de carotenoides en tomate.

### 2. Materiales y métodos

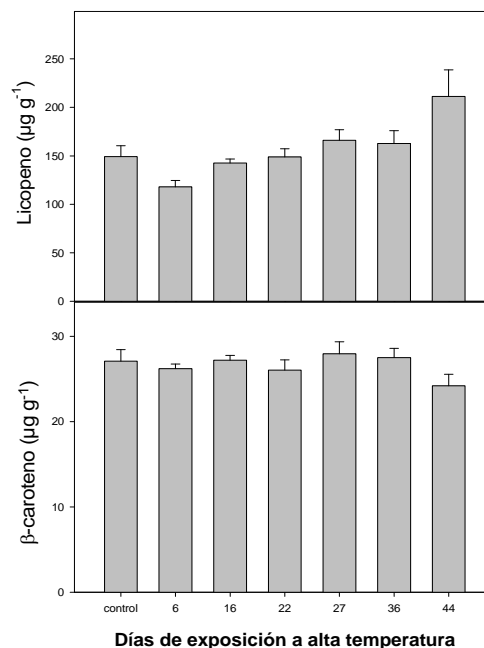
Se cultivaron plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Velasco) en cámaras de crecimiento bajo condiciones de temperatura y humedad controladas, utilizando como sustrato fibra de coco y perlita (85:15). Las plantas se cultivaron inicialmente a temperatura óptima (24/13 °C, día/noche) hasta que se pudieron diferenciar seis estadios de desarrollo del fruto diferentes, momento en el cual la temperatura se incrementó hasta 32/19 °C (día/noche). Los estadios de desarrollo considerados fueron: floración (44 días expuestos a alta temperatura (DAT)); estadio 1 ( $\varnothing \leq 30$  mm, 36 DAT); estadio 2 ( $\varnothing \leq 40$  mm, 27 DAT); estadio 3 ( $\varnothing \leq 50$  mm, 22 DAT); estadio 4, ( $\varnothing \leq 60$  mm, 16 DAT); estadio 5 (fruto verde desarrollado, 6 DAT).

Además, un grupo de plantas se mantuvo a la temperatura inicial hasta el final de la maduración del fruto (control). Todos los frutos, los pertenecientes al tratamiento control y a los seis estadios de desarrollo, se recolectaron en estado de maduración de fruto totalmente rojo, exento de zonas verdes, manchas amarillas y marrones.

Los carotenoides se extrajeron según el método descrito por Bohm (2001). El extracto obtenido se analizó en un cromatógrafo líquido Agilent 1200 (Waldbronn, Alemania) equipado con un detector diodos array (DAD). La cuantificación de los compuestos se realizó mediante comparación con estándares externos (DHI LAB, Hoersholm, Dinamarca) a excepción de  $\gamma$ -caroteno, fitoeno, y fitoflueno que fueron expresados como equivalentes de  $\beta$ -caroteno. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA), utilizando el programa estadístico SPSS 21.

### 3. Resultados y discusión

El aumento de la temperatura, impuesto en frutos verdes totalmente desarrollados (estadio 5), provocó una disminución de la concentración de licopeno total (calculado como la suma de los isómeros *all-trans*, *13-cis* y *5-cis* licopeno) en fruto maduro (Figura 1A). Esta disminución de licopeno fue paralela a una disminución de la concentración de sus precursores fitoeno y fitoflueno, y a un aumento de luteína (producto) (Tabla 1). En estadios más tempranos, el efecto inhibitor de la temperatura sobre la acumulación de licopeno y sus precursores y el efecto estimulador sobre luteína, disminuyeron de forma proporcional al tiempo de exposición a 32 °C, llegando a alcanzar, en el caso de frutos sometidos a altas temperaturas desde la floración, concentraciones de fitoeno y licopeno superiores a las del control. Por otro lado, la concentración de  $\beta$ -caroteno no se vio afectada por el aumento de temperatura en ninguno de los estadios estudiados. Sin embargo, las concentraciones de violaxantina y  $\gamma$ -caroteno, disminuyeron de forma proporcional al tiempo de exposición al estrés térmico.



**Figura 1.** Concentración de licopeno (A) y  $\beta$ -caroteno (B) total, en frutos expuestos a alta temperatura (32 °C) durante diferentes periodos de tiempo.

Compuesto	Días de exposición a alta temperaturas						
	0	6	16	22	27	36	44
Luteína	11.2	128 <sup>ab</sup>	13.8 <sup>ab</sup>	13.2 <sup>ab</sup>	13.4 <sup>ab</sup>	13.7 <sup>a</sup>	12.2 <sup>c</sup>
Violaxantina	3.1 <sup>a</sup>	3.0 <sup>a</sup>	2.5 <sup>b</sup>	2.5 <sup>b</sup>	2.2 <sup>c</sup>	1.8 <sup>c</sup>	1.1 <sup>d</sup>
Fitoeno	16.8 <sup>a</sup>	8.5 <sup>a</sup>	9.9 <sup>ab</sup>	11.4 <sup>ab</sup>	13.5 <sup>ab</sup>	22.7 <sup>ab</sup>	24.4 <sup>a</sup>
Fitoflueno	7.8 <sup>b</sup>	4.2 <sup>b</sup>	5.1 <sup>cd</sup>	5.4 <sup>cd</sup>	6.2 <sup>c</sup>	6.3 <sup>cd</sup>	6.7 <sup>c</sup>
All-trans licopeno	100.4 <sup>a</sup>	78.5 <sup>a</sup>	94.9 <sup>ab</sup>	99.3 <sup>ab</sup>	111.3 <sup>ab</sup>	107.2 <sup>a</sup>	143.6 <sup>a</sup>
13-cis licopeno	4.8 <sup>a</sup>	5.2 <sup>ab</sup>	6.6 <sup>ab</sup>	6.4 <sup>ab</sup>	7.1 <sup>ab</sup>	8.5 <sup>b</sup>	9.3 <sup>b</sup>
5-cis licopeno	3.3 <sup>a</sup>	1.9 <sup>bc</sup>	1.8 <sup>c</sup>	2.2 <sup>bc</sup>	1.8 <sup>c</sup>	2.2 <sup>bc</sup>	1.9 <sup>cd</sup>
All-trans $\beta$ -caroteno	25.7	24.6	25.2	24.2	25.9	24.5	21.6
9-cis $\beta$ -caroteno	0.6	0.6	0.7	0.6	0.7	0.7	0.5
13-cis $\beta$ -caroteno	0.9 <sup>d</sup>	1.0 <sup>cd</sup>	1.3 <sup>bc</sup>	1.2 <sup>bc</sup>	1.4 <sup>bc</sup>	1.4 <sup>bc</sup>	1.3 <sup>c</sup>
All-trans $\gamma$ -caroteno	3.2 <sup>a</sup>	2.8 <sup>b</sup>	2.8 <sup>b</sup>	2.3 <sup>c</sup>	2.1 <sup>c</sup>	1.9 <sup>c</sup>	2.0 <sup>c</sup>

**Tabla 2.** Concentración de carotenoides ( $\mu\text{g g}^{-1}\text{PF}$ ) en frutos de tomate expuestos durante diferentes periodos de tiempo a alta temperatura (32 °C).

El estrés causado por altas temperaturas provoca una alteración de la composición del fruto a través de modificaciones tanto a nivel fisiológico como a nivel bioquímico. A nivel de planta, el aumento de la temperatura modifica la distribución de fotoasimilados entre los diferentes órganos y se produce una mayor translocación de biomasa hacia los frutos, en detrimento del crecimiento vegetativo [6], lo que modifica, de forma indirecta, la síntesis de



metabolitos en fruto. Además, el aumento de temperatura por encima de los valores óptimos, puede alterar de forma directa los procesos de síntesis/degradación de los metabolitos. [7]Según Gautier et al. (2008), el enzima fitoeno sintasa (PSY), responsable de la formación de fitoeno a partir de dos moléculas de geranylgeranyl-difosfato (GGPP), juega un papel fundamental en la regulación de la biosíntesis de carotenoides. PSY se inhibe por el aumento de la temperatura, principalmente a nivel transcripcional [8,9], y dicha inhibición podría explicar la disminución observada en la concentración de fitoeno, fitoflueno y su producto licopeno, en frutos sometidos a alta temperatura durante un corto periodo (estadio 5). Algunos autores sugieren que la disminución de licopeno puede deberse a una degradación de este compuesto hacia la formación de  $\beta$ -caroteno [7]. Sin embargo, nuestros resultados sugieren además, una degradación de licopeno hacia la formación de luteína. Con el aumento del tiempo de exposición al estrés térmico, disminuyeron los efectos de la temperatura sobre la concentración de fitoeno, fitoflueno, licopeno y luteína, lo que sugiere una aclimatación de la planta y/o un posible reestablecimiento de los procesos de síntesis de carotenoides durante los intervalos de tiempo en los que disminuye la temperatura a lo largo del fotoperiodo.

A diferencia de lo que ocurre con licopeno, la concentración de  $\beta$ -caroteno no se vio afectada por el aumento de temperatura. [10]Según Gonord et al., (2010), los mecanismos de control de retroalimentación y canalización metabólica entre cada rama de la ruta de isoprenoides, desempeñan un papel fundamental en la concentración final de cada compuesto. Así, el hecho de que la concentración de  $\beta$ -caroteno se mantuviera estable podría estar relacionado por una parte, con el aumento de la degradación de licopeno y  $\gamma$ -caroteno y por otra, con una disminución del catabolismo de  $\beta$ -caroteno hacia la formación de violaxantina, lo que explicaría la disminución observada en la concentración de este último compuesto.

Además, de estos cambios metabólicos en la ruta de biosíntesis de los isoprenoides, el estrés térmico provocó un aumento de la concentración de isómeros 13-cis de  $\beta$ -caroteno y licopeno. La formación de isómeros cis a partir de las formas all-trans por efecto del aumento de la temperatura ha sido descrito en la bibliografía tanto en productos de tomate procesados como en frutos de tomate cortados [11]. Aproximadamente, el 90 % del licopeno

que incorporamos diariamente en nuestra dieta, está en la conformación all-trans, sin embargo los tejidos celulares contienen principalmente isómeros cis. Las formas cis, aunque son más inestables [12], presentan mayor biodisponibilidad que los isómeros trans, debido a su menor longitud y baja tendencia a formar agregados, lo que les confiere mayor solubilidad [13,14].

#### 4. Conclusiones

El aumento de la temperatura durante cortos periodos de tiempo (6 días) provocó una disminución de la concentración de licopeno, principal carotenoide que contiene el tomate, y de fitoeno y fitoflueno, de cuyas propiedades funcionales, aunque existen evidencias, se dispone de poca información. También se produjo una disminución de la concentración de violaxantina y  $\gamma$ -caroteno, proporcional al tiempo de exposición. Por el contrario, la exposición a alta temperatura produjo un incremento de la concentración de luteína y no afectó a la concentración de  $\beta$ -caroteno. Tras un periodo de aclimatación, se restablecieron las concentraciones de la mayoría de los compuestos estudiados, excepto la de violaxantina y  $\gamma$ -caroteno, llegándose a alcanzar los valores encontrados en los frutos del tratamiento control e incluso, en el caso de licopeno y fitoeno, valores superiores a los del control. Además, el aumento de temperatura favoreció, la formación de isómeros cis de licopeno y de  $\beta$ -caroteno, mas inestables pero mas biodisponibles para el organismo que sus correspondientes isómeros trans. Estos resultados muestran la capacidad de la planta para aclimatarse al estrés térmico, aprovechando los periodos de tiempo en los que la temperatura disminuye a lo largo del fotoperiodo, consiguiendo disminuir el efecto negativo del estrés térmico moderado (32 °C) sobre la calidad funcional del fruto, en particular, sobre la concentración y estereoisomería cis-trans de compuestos relevantes para la salud, como es el caso de licopeno.

#### 5. Agradecimientos

Los autores quieren agradecer al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) la financiación de este trabajo a través del proyecto RTA2010-00119-00-00.

#### 6. Referencias

- [1] Erge, H. y Karadeniz, F. (2001). Bioactive compounds and antioxidant activity of tomato cultivars. *International Journal of Food Properties*, 14, 968-977.
- [2] Mein, J.R., Lian, F., Wang, X. D. (2008). Biological activity of lycopene metabolites: implications for cancer prevention. *American Society for Clinical Nutrition*, 66, 667–683.
- [3] Sommerburg, O., Keunen, J., Bird, A., Frederik, J., Kuijk. (1998). Fruits and vegetables that are sources for lutein and zeaxanthin: the macular pigment in human eyes. *British Journal Ophthalmology*, 82, 907-910.
- [4] Lindqvist, A., He, YG., Andersson, S. (2005). Cell type-specific expression of betacarotene 9', 10'-monooxygenase in human tissues. *Journal Histochem Cytochem*, 53, 1403–12.
- [5] Dumas, Y., Dadomo, M., Di Lucca, G., Grolier, P. 2003. Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 369-382.
- [6] De Koning, A. N. M. (1996). Quantifying the response to temperature of different plant processes involved in growth and development of glasshouse tomato. *Acta Horticulturae*, 406, 99-104.
- [7] Gautier, H., Diakou-Verdin, V., Benard, C. (2008). How does tomato quality (sugar, acid, and nutritional quality) vary with ripening stage, temperature, and irradiance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1241-1250.
- [8] Bramley, P. M. (2002). Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *Journal of Experimental Botany*, 53, (377), 2107-2113.
- [9] Fraser, P.D., Bramley, P. M. (2004). The biosíntesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, 43(3), 228-265.
- [10] Gonord, F., Bidel, L., Fanciullino, A., Gautier, H., Lopez, F., Urban, L. (2010). Health benefits of vitamins and secondary metabolites of fruits and vegetables and projects to increase their concentrations by agronomic approaches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 12065-12082.
- [11] Boileau, T., Boileau, AC., Erdman, JW. (2013). Bioavailability of all- trans and cis Isomers of Lycopene. *Experimental Biology and Medicine*, 227, 914-919.
- [12] Peterson, W. (1996). *Formulación y nomenclatura química orgánica. Ediciones y distribuciones universitarias S.A. Barcelona, España.*
- [13] Nguyen, ML., Schwartz, SJ. (1998). Lycopene stability during food processing. *Proceeding of the Experimental Biology and Medicine*, 218, 101–105.
- [14] Boileau, AC., Merchen, NR., Wasson, K., Atkinson, CA., Erdman, JW. (1999) Cis-lycopene is more bioavailable than trans-lycopene in vitro and in vivo in lymph-cannulated ferrets. *Journal of Nutrition*, 129, 1176–1181.

# Efecto de agentes desinfectantes alternativos al hipoclorito sódico en la calidad de habas mínimamente procesadas en fresco

M. Otón<sup>(1)</sup>, F. Artés<sup>(1,2)</sup>, F. Artés-Hernández<sup>(1,2)</sup>

<sup>(1)</sup> Instituto de Biotecnología Vegetal. UPCT. Campus Muralla del Mar. 30202 Cartagena, Murcia, España

<sup>(2)</sup> Grupo de Postrecolección y Refrigeración, Dpto. Ingeniería de Alimentos, ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena, Murcia, España.

## RESUMEN

En la búsqueda de alternativas al habitual empleo en la desinfección del hipoclorito sódico durante el procesado mínimo de los productos hortofrutícolas, se recurre otros agentes antimicrobianos, que además de inhibir la contaminación microbiológica, sean capaces de actuar como agentes antipardeantes (ácido oxálico, dióxido de cloro, ácido ascórbico y 4-hexilresorcinol), para inhibir en todo lo posible el pardeamiento enzimático que sucede sobre la superficie de las semillas de las habas mínimamente procesadas al finalizar su vida comercial. Este defecto provoca que las semillas sean no comercializables por su aspecto visual aunque la calidad microbiana sea adecuada. Para ellos se eligió una variedad de haba y una temperatura de vida comercial de 5°C durante 8 días. De todos los tratamientos estudiados, el dióxido de cloro y el ácido ascórbico fueron los que mejores resultados obtuvieron frente a los demás tratamientos, controlando el pardeamiento.

**Palabras clave:** *Vicia Faba*; ácido oxálico; 4-hexilresorcinol; dióxido de cloro.

## 1. Introducción y Objetivos

Los objetivos de este trabajo consisten en ensayar nuevos agentes desinfectantes con capacidad antioxidante para comprobar cómo se comportan con respecto al testigo que viene siendo habitual en la Empresa a base de hipoclorito sódico, tal como permite la legislación vigente. Se deberá conocer si consiguen efectos similares al hipoclorito sódico para inhibir el crecimiento de microorganismos.

Igualmente se pretende conocer el efecto de estos nuevos agentes en el control del pardeamiento en las habas.

El mayor problema que tiene la utilización del hipoclorito sódico, es que utilizado en niveles excesivos puede dar lugar a la formación de trihalometanos, compuestos con potenciales niveles de toxicidad, que incluso se han llegado a considerar potencialmente cancerígenos [1] [2]. En efecto, éstos compuestos son subproductos que se forman en el agua por la combinación de materia orgánica y derivados halogenados como cloro y se han relacionado con algunos tipos de cáncer, como cáncer de pulmón, de pecho en mujeres y de vejiga en hombres. Por ello será sin duda interesante

conocer si existe alguna otra sustancia que se pueda utilizar con los mismos efectos que el hipoclorito sódico [3] y que pueda constituir una alternativa a corto plazo, en el caso de que cambie la legislación vigente [4] y prohíba su uso a como ya sucede en otros países europeos como Holanda y Alemania. Además podría ser una alternativa comercial, por ejemplo indicando en el envase que el producto ofrecido está libre de cloro.

## 2. Materiales y Métodos

En este ensayo se utilizarán compuestos que han mostrado cierta actividad antipardeante y microbicida con otros productos hortofrutícolas mínimamente procesados en fresco, según la bibliografía científica y que se detallan a continuación.

Las habas de la variedad “Granulla” se transportaron al almacén de la Empresa en El Estrecho (Fuente Álamo, Murcia) en palox. A su llegada se dispusieron en una cámara frigorífica, para lograr su enfriamiento hasta unos 5-7°C. El producto elaborado se trasladó a las instalaciones refrigeradas del GPR-UPCT donde se observó la evolución de la calidad tras 8 días a 5°C para todos los tratamientos ensayados.

Los tratamientos realizados fueron:

**T1:** lavado con ácido oxálico (0,02%) + ácido ascórbico (1%) durante un tiempo de 3 minutos.

**T2:** lavado con Dióxido de Cloro (4 ppm) durante 2 minutos.

**T3:** (Control) lavado con hipoclorito sódico (150 ppm) + ácido cítrico (5g/25L) durante 2 minutos y un enjuagado de 1 minuto

**T4:** lavado durante 2 minutos con ácido isoascórbico con una concentración de 0,05mol/L.

**T5:** lavado durante 3 minutos con 4-hexilresorcinol en una concentración al 0,1%.

### 2.1. Determinación de la composición gaseosa

Se determinó la concentración de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en el interior de los envases con semillas de haba bajo atmósfera modificada-AM [5] durante la conservación frigorífica a 5°C en los tratamientos T2 y T4. La toma de muestras se realizó mediante una jeringuilla del tipo “de insulina”, con la que se tomaron muestras gaseosas de 0,5 mL del espacio de cabeza del envase, y se analizó la cantidad de CO<sub>2</sub> y de O<sub>2</sub> periódicamente en el CG (Thermofinnigan GC, Milán, Italia) provisto de un detector de conductividad térmica (TCD. El calibrado y comprobación del funcionamiento de los CG se realizó mediante botellas de patrones de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> de concentración conocidas (Air Liquide S.A., Murcia, España)

### 2.2 Análisis sensorial

Para determinar los efectos que tuvieron los tratamientos aplicados sobre las características organolépticas de las habas en cada salida de conservación y al inicio de cada experiencia, se sometieron a la evaluación por un panel de catadores de ambos sexos, compuesto por miembros del Grupo de Postrecolección y Refrigeración de la UPCT, con edades comprendidas entre 25 y 60 años, en un número nunca inferior a 5 [6].

### 2.3. Análisis microbiológicos

Con el objeto de conocer el estado sanitario de las habas para comprobar que cumplían la legislación [7], 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 60 segundos. 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.

Para la determinación de los microorganismos mesófilos como flora aerobia, las placas fueron incubadas en Plate Count Agar (PCA) a 30°C durante 48 horas. Cuando se estudiaron enterobacterias se utilizó como medio “Violet Red Bile Dextrose Agar” (Scharlau, Barcelona, España) incubándose a 37°C durante 24-36 h.

### 2.4 Análisis estadístico

Para estudiar el efecto de los tratamientos sobre los distintos atributos de calidad, se realizó un ANOVA, y se establecieron diferencias significativas a P= 0,01 mediante el test de rango múltiple LSD empleando el programa informático Statgraphics plus versión 5.1.

## 3. Resultados y Discusión

### 3.1. Composición gaseosa

Apenas hubo variación en la concentración de las bolsas (Figura 1) durante los 8 días que duró el experimento. La concentración final alcanzada es de 5 kPa de O<sub>2</sub> y de unos 20 kPa de CO<sub>2</sub> alcanzando el equilibrio a partir del primer día como viene siendo habitual y recomendado.

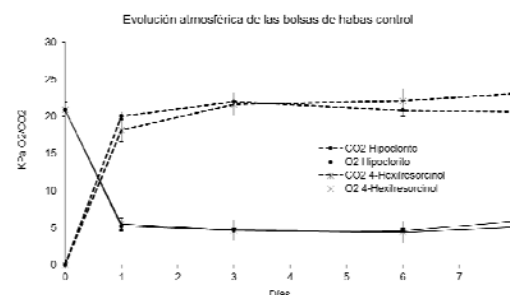


Figura 1. Evolución gaseosa tras 8 días 5°C

### 3.2 Análisis sensorial

La apariencia visual al inicio (Tabla 1) fue buena para todos los tratamientos y así se mantuvo hasta el día 6. Tras 8 días de comercialización se observó como el tratamiento de 4-hexilresorcinol mostró una muy mala apariencia debido fundamentalmente a pardeamientos. También se observaron pardeamientos tras 8 días en el tratamiento testigo a base de hipoclorito sódico + ácido cítrico y en el que se usó ácido oxálico. Estos pardeamientos fueron suficientemente importantes para en una apreciación visual, calificar como no aceptables los productos.

Los tratamientos de dióxido de cloro y ácido isoascórbico obtuvieron una buena calificación de aspecto visual, tras una conservación de 8 días, consiguiendo inhibir los pardeamientos sucedidos en los otros tratamientos.

Estas apreciaciones en la apariencia coinciden con los datos determinados en el color, ya que los pardeamientos condicionaron sin duda la apreciación visual del producto

Un hecho similar sucedió al evaluar la pérdida de brillo de las habas, el tratamiento a base de 4-hexilresorcinol obtuvo una muy grave pérdida de brillo al 99,9% de probabilidad. El resto de tratamientos obtuvo una pérdida de brillo entre leve y moderada, pero que fue calificada como de aceptable.

Al evaluar los pardeamientos tras 6 días de comercialización no se observaron pardeamientos en las habas y todos los tratamientos fueron comercializables. Pero al finalizar los 8 días que los tratamientos que controlaron mejor el pardeamiento fueron el dióxido de cloro y ácido isoascórbico.

El sabor de las habas, tras 6 días de conservación, todos los tratamientos se calificaron con sabor de ligeramente bueno a bueno. Pero al finalizar los 8 días de comercialización el único tratamiento donde se observaron sabores extraños comunicados por el agente utilizado fue en el tratamiento a base de 4-hexilresorcinol.

La calidad global de las semillas de habas indicó que los tratamientos 6 días de conservación presentaron un sabor de ligeramente bueno a bueno, con una gran aceptabilidad. Sin embargo, tras 8 días de comercialización se observó como el tratamiento de 4-hexilresorcinol mostró una apariencia muy mala lo que ocasionó que se calificara con valores muy bajos.

Los tratamientos de dióxido de cloro y de ácido isoascórbico obtuvieron una buena calificación global.

**Tabla 1.** Análisis sensorial durante de 8 días a 5°C.

Apariencia	Tiempo (días a 5°C)			
	Inicio	3	6	8
T1	7,4	7	6,3	4
T2	7,4	7,5	6,8	6,5
T3	7,4	7	6	4
T4	7,4	7	7	7
T5	7,4	7,25	6,1	2,8
LSD(P≤0,01)=0,90				
Color	Tiempo (días a 5°C)			
	Inicio	3	6	8

T1	7,25	7	6	4,75
T2	7,5	7,25	7	6,25
T3	7,25	7	6	4
T4	7,25	7	7	7
T5	7,25	7,25	6,125	2,5
LSD(P P≤0,01)= 1,39				
Pérdida Brillo	Tiempo (días a 5°C)			
	Inicio	3	6	8
T1	1,5	1	1	2,5
T2	1,5	1	1	2
T3	1,5	1	1,5	3
T4	1,5	1	1,5	2
T5	1,5	1	1,5	4,75
LSD(P≤0,01)= 1,36				
Pardeamiento	Tiempo (días a 5°C)			
	Inicio	3	6	8
T1	1	1	1	3
T2	1	1	1	1,75
T3	1	1	1,4	3,6
T4	1	1	1	1
T5	1	1	1,4	4,5
LSD(P≤0,01)= 0,88				
Sabor	Tiempo (días a 5°C)			
	Inicio	3	6	8
T1	8	7,5	6,5	5
T2	7,5	7,5	7	7,1
T3	7,5	7	6,5	6,5
T4	8	7	7	7,1
T5	8	6,3	6,5	3,7
LSD(P≤0,01)= 1,58				
Calificación Global	Tiempo (días a 5°C)			
	Inicio	3	6	8
T1	7,7	7,5	6,5	4
T2	7,6	7,3	7	6,5
T3	7,6	7	6,5	3,8
T4	7,6	7	7	7
T5	7,6	6,8	6,5	2,5
LSD(P≤0,01)= 0,84				

Escala de puntuación organoléptica para Apariencia, Color y Calificación Global:

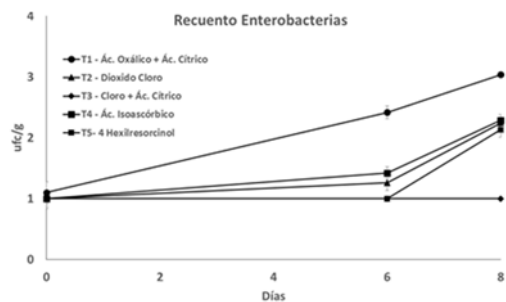
1: extremadamente desagradable; 3: desagradable; 5: moderado; 7: bueno y 9: excelente

Escala de puntuación de intensidad de alteraciones para pérdida de brillo, deshidratación, pardeamiento y aromas extraños  
 1: sin daños o pérdidas, 2: leves daños o pérdidas, 3: aceptable como límite de consumo, 4: algunos daños o pérdidas, 5: muy dañado

### 3.3. Análisis microbiológicos

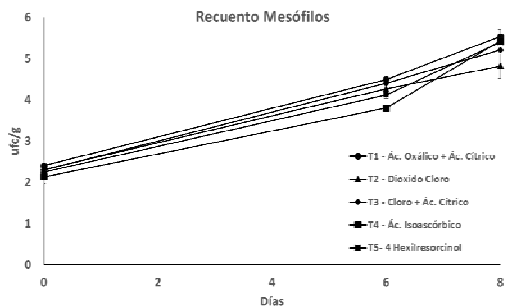
El análisis de enterobacterias (Figura 1) se mantuvo también dentro de los límites establecidos por la legislación correspondiente, aunque se observa una contaminación más acusada en el tratamiento de oxálico + cítrico. En el resto de tratamientos alternativos al empleo de hipoclorito sódico junto con ácido cítrico, cabe destacar la nula presencia de enterobacterias tras 6 días a 5°C aunque los recuentos registrados al finalizar los 8 días a 5°C muestran como todos los tratamientos ensayados como alternativos obtuvieron unos conteos muy similares con cerca de 2 ufcg<sup>-1</sup>,

todos ellos por debajo de lo establecido en la legislación.



**Figura 3.** Recuento de Enterobacterias tras 8 días 5°C

En la Figura 2 vemos el indicador de vida útil (microorganismo mesófilos) usado para ver cómo se comportaban las habas, presenta en el día de fabricación se obtuvieron para todos los tratamientos conteos de ligeramente superiores a 2 ufc·g<sup>-1</sup>, y tras 8 días a 5°C de conservación, fecha establecida como vida útil del producto, no se superaron las 6 ufc·g<sup>-1</sup>



**Figura 2.** Recuento de Mesófilos tras 8 días 5°C

#### 4. Conclusiones

Como alternativas al hipoclorito sódico en la fase de lavado y desinfección se podría eventualmente utilizar el dióxido de cloro y el ácido isoascórbico ya que controlaron el crecimiento microbiano y disminuyen los pardeamientos durante la vida útil del producto. Como barrera a estos posibles tratamientos alternativos, no encontramos que el precio de aplicación es sustancialmente más alto que el uso de Hipoclorito.

#### 5. Agradecimientos

A Frutas Esparza S.A. por la financiación recibida.

#### 6. Referencias bibliográficas

- [1] IARC. (1999a). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. In Reevaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide (Vol. 71). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- [2] IARC. (1999b). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. In Somechemicals that cause tumours of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances (Vol. 73). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- [3] Gil, Maria I.; Selma, Maria V.; López-Gálvez, Francisco; Allende, Ana (2009) Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions. International Journal of Food Microbiology vol. 134 (1) p. 37-45
- [4] España. Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. Boletín Oficial del Estado, 21 de febrero de 2003, núm 45, pp. 7228-7245.
- [5] Artés, F., Gómez, P. A., Tomás-Callejas, A., & Artés-Hernández, F. (2011). Fresh-cut fruit and vegetables: New trends, methods and impacts. In J. M. McMann (Ed.), Potable Water and Sanitation Hauppauge (pp. 1–36). New York, USA: Nova Science Publishers. ISBN: 978-1-6-61122-319-4.
- [6] 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. 49-61.
- [7] Regulation EC 1441/2007. 2007. Commission regulation on microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of the European Union L. 322, 12–29.

## Efecto de las altas presiones de homogeneización frente a la pasteurización en un producto nutraceútico con alto contenido en hierro y vitamina C

A. García-González<sup>(1)</sup>, M.P. Tarazona-Díaz<sup>(1)</sup>, P.A. Gómez<sup>(2)</sup>, E. Aguayo<sup>(1,3)</sup>

<sup>(1)</sup> Grupo de Postrecolección y Refrigeración. Dpto. Ingeniería de Alimentos. ETSIA-UPCT. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena, España. Tel.: 968 325750. antonio-garcia-gonzalez@hotmail.com

<sup>(2)</sup> Instituto de Biotecnología Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). Campus Muralla del Mar. 30202 Cartagena, España.

<sup>(3)</sup> Unidad Calidad Alimentaria y Salud. Instituto de Biotecnología Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). Campus Muralla del Mar. 30202 Cartagena, España.

### RESUMEN

La aplicación de altas presiones de homogeneización (APH) en productos nutraceúticos es muy reciente, limitada a algunos productos como zumos y leches. Hasta ahora, nunca se había utilizado en productos nutraceúticos, donde el mantenimiento de la calidad sensorial, microbiológica y, muy especialmente, funcional durante su periodo de vida útil es primordial para el consumidor. En el presente trabajo se analizó si la aplicación de APH (80 y 120 MPa) podrían ser un tratamiento sustitutivo de la pasteurización (80 °C, 15 min) de un jarabe funcional rico en hierro y vitamina C. La evaluación se efectuó sobre los parámetros previamente citados después de someter el producto a condiciones de estabilidad acelerada (0, 2, 4 y 6 meses a 40 °C y 75% HR) y a largo plazo (0, 3, 6, 9, 12 y 24 meses a 25°C y 60% HR). Como resultado mencionar que la aplicación de APH redujo en un 20% las pérdidas de vitamina C frente a un tratamiento térmico convencional. Sin embargo, el contenido en hierro fue bastante estable sin verse afectado por la técnica de procesado utilizada siendo asociadas al periodo de almacenamiento y situándose alrededor de un 14%. El empleo de APH logró mantener la calidad funcional del producto nutraceútico evaluado pudiéndose aplicar a escala industrial.

**Palabras clave:** jarabe funcional; vida útil; degradación; bioactivos.

### 1. Introducción

La alta presión de homogeneización (APH) es una técnica emergente de gran interés en la industria de alimentos. Se conoce desde finales del siglo XIX, sin embargo, es en la década de 1980 cuando se empieza a investigar de forma exhaustiva. En 1986 salieron al mercado los primeros alimentos presurizados procesados de tipo ácido como zumos y derivados de frutas [1] y en 1995 se comercializaban mermeladas y salsas. Con el fin de minimizar la pérdida de calidad, y encontrar una alternativa a los tratamientos térmicos para productos de larga vida útil, la técnica de APH adquiere un gran interés. Es una tecnología de procesado que combina la alta presión con mínima temperatura, reduciendo la degradación de compuestos bioactivos, permitiendo la formulación y estabilidad de emulsiones, y dependiendo de las condiciones de APH aplicadas a los alimentos, puede conseguirse una degradación microbiana y enzimática [2,3]. Por otro lado, en la sociedad actual existe un interés

por el consumo de alimentos bioactivos o nutraceúticos, que mejoran la calidad de vida de los consumidores. Estos productos ofrecen beneficios en la promoción y prevención de algunas enfermedades crónicas como enfermedades cardiovasculares, cáncer, desórdenes del sistema autoinmune, diabetes, artritis y arritmia.

Basándonos en estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la calidad funcional de un producto nutraceútico rico en hierro y vitamina C, al someterlo a un tratamiento térmico convencional o APH, averiguando si las altas temperaturas o presiones aplicadas causaban pérdidas de ingredientes bioactivos. Para evaluar la eficacia de la tecnología se analizó la vida útil a tiempo real durante 24 meses a 25° C y en condiciones aceleradas durante 6 meses a 45°C.

### 2. Materiales y Métodos

Se utilizó un jarabe comercial (Ferrobine) caracterizado por contener una fuente de hierro (1,4 mg/mL) combinada con vitamina C (3 mg/mL), estando indicado para el tratamiento y prevención de anemia por deficiencia de hierro y nutricionales. Se aplicaron tres tratamientos: Testigo (pasteurización a 80 °C, 15 min, 0,1 MPa) y dos correspondientes a APH: 80 MPa (33 °C, 5 segundos) y 120 MPa (43 °C, 5 segundos) procesándose de forma continua sin tiempos de residencia. Una vez tratados los productos, se envasaron en envases de vidrio de color ámbar evitando las pérdidas de compuestos funcionales por efecto de la oxidación lumínica y se sometieron a estudios de estabilidad en cámara a tiempo real (25° C ± 2 ° C y 60 ± 5% HR) y en condiciones aceleradas (6 meses a 40° C ± 2 ° C y 75 ± 5% HR). Para alcanzar la HR mencionada se utilizó un sistema de humidificación industrial (Tecnidex control – TEC H, Valencia, España). Se utilizaron 3 repeticiones (botes) de 250 mL de jarabe por tratamiento y día de análisis en los que se determinaron el contenido en hierro y vitamina C.

### 2.1 Contenido en hierro

Se empleó la técnica de espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry), utilizando un equipo ICP-MS (Agilent Technologies 7500 ce, Japón). Para cada muestra se realizó una dilución (1:1000) con agua desionizada. Se realizó la inyección de la muestra líquida en el equipo citado.

### 2.2 Vitamina C

Se tomaron 10 mL de muestra y se colocaron en un tubo falcón cubierto con papel de aluminio, se adicionó 10 mL de agua milli-Q y se agitó en un vortex. Seguidamente, las muestras se filtraron con un filtro de nylon de 0,45 µm (Micron Analítica S.A. Madrid, España) y se llevó a un vial para la determinación por HPLC con detector de espectrofotometría UV-vis (Water 2695, Alliance, Singapur). La cuantificación se llevó a cabo mediante una curva estándar de L-ácido ascórbico.

Para cada tratamiento y momento de conservación se calculó la media aritmética y su error estándar (ES).

## 3. Resultados y Discusión

### 3.1. Contenido en hierro

El contenido en hierro fue bastante estable, como se puede observar en los resultados obtenidos tanto en condiciones reales como aceleradas (Figura 1). No se apreciaron diferencias significativas entre las muestras pasteurizadas y las sometidas a APH, concluyéndose que este tipo de bioactivo no se vio afectado por el tipo de proceso aplicado, estando las pérdidas asociadas al periodo de almacenamiento. Estas reducciones se situaron en torno a un 13-14 % para ambos tratamientos (Tabla 1), cumpliéndose los valores que se proponen para la funcionalidad de este producto durante una vida útil de 24 meses.

### 3.2 Vitamina C

Destacar la caída significativa a tiempo 0 de la vitamina C debido al efecto térmico de la pasteurización siendo la degradación mucho menor al utilizar tratamientos de APH (Figura 2). En la conservación a largo plazo, la utilización de ambos tratamientos de APH amortiguó la reducción de vitamina C frente a la utilización de la pasteurización. Así, los porcentajes de pérdida observados fueron desde un 85% de pérdida total obtenidos en la pasteurización frente a los 45% y 48% obtenidos en los tratamientos de APH (Tabla 2), los cuales estarían dentro de los límites de tolerancia admitidos para una extensión de la vida útil de 24 meses. Estas observaciones coinciden con las analizadas en el ensayo predictivo o de estabilidad acelerada (Figura 2), observándose la tolerancia de esta vitamina a las APH, no existiendo desintegración o eliminación de la misma, con valores de pérdida de 0,4 y 2,3% para los tratamientos de 80 MPa y 120 MPa, respectivamente. La APH frente a la pasteurización permitió una mayor estabilidad de la vitamina C durante el procesado del producto. Las pérdidas de vitaminas tras el procesado de pasteurización son en gran medida dependientes del contenido de oxígeno disuelto. De esta forma el procesado mediante homogenización dinámica a AP permite reducir la incorporación de oxígeno durante el procesado al requerir de menor tiempo de mezcla en el reactor, principalmente por suprimir las etapas de enfriamiento de 80°C a 40°C con un tiempo de 15 a 30 minutos y la etapa de homogeneización de 15 a 20 minutos a segundos. Los tratamientos a APH permiten mitigar factores que afectan directamente a la sensibilidad de esta vitamina como son los agentes oxidantes y la temperatura.



#### 4. Conclusiones

La utilización de APH frente a un tratamiento térmico convencional permitió un mejor mantenimiento de la vitamina C y una mayor vida útil del producto, con una óptima calidad funcional. La pasteurización representó porcentajes de pérdidas de vitamina que quedan fuera de los rangos de tolerancia admitidos para periodo mínimo de vida útil de 24 meses. El contenido en hierro no se vio afectado por la aplicación de APH.

#### 5. Agradecimientos

Se agradece a la empresa Martínez-Nieto S.A. el equipamiento y los productos facilitados para la realización de este experimento.

#### 6. Referencias bibliográficas

[1] Velázquez G., Vázquez P., Vázquez M., Torres, J.A. 2005. High Pressure Food Processing Applications. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 4:343-352.

[2] Polisel-Scopel F.H., Gallardo-Chacón J.J., Guamis B., Ferragut, V. 2013. Characterization of volatile profile in soymilk treated by ultra high pressure homogenization. *Food Chem.* 141: 2541–2548.

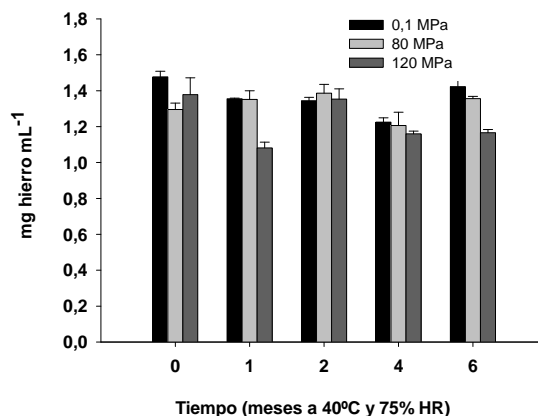
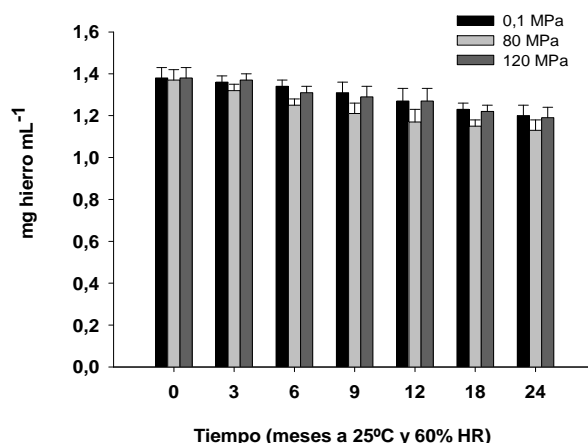
[3] Polisel-Scopel F.H., Hernández-Herrero M., Guamis, B., Ferragut, V. 2012. Comparison of ultra high pressure homogenization and conventional thermal treatments on the microbiological, physical and chemical quality of soymilk. *LWT – Food Sci. Technol.* 46: 42–48.

**Tabla 1.** Porcentaje de pérdidas de hierro a tiempo real de un jarabe funcional tratado a diferentes presiones y sometido a estudio de estabilidad (24 meses, 25°C y 60% HR).

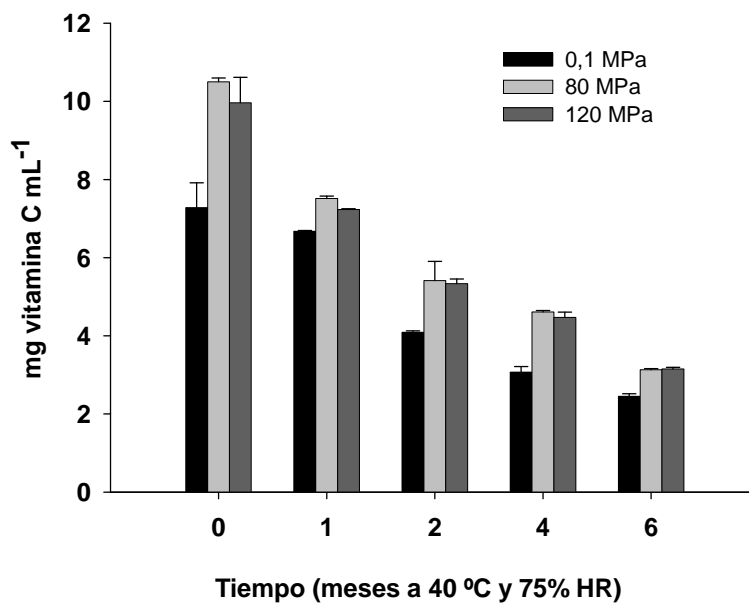
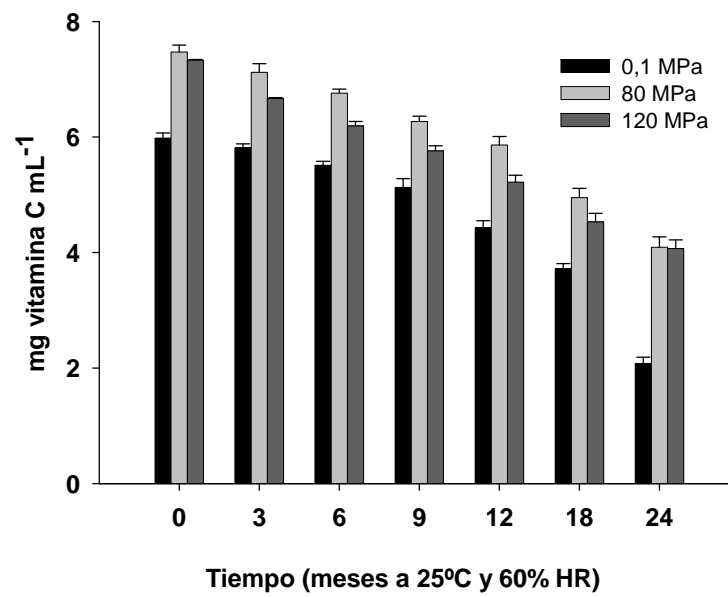
Momento	0,1 MPa	80 MPa	120 MPa
<b>Fin tratamiento (0 d)</b>	1,43	2,14	1,43
<b>Fin conservación (24 meses)</b>	13,04	13,52	13,77
<b>Total</b>	14,47	15,66	15,20

**Tabla 2.** Porcentaje de pérdidas de vitamina C a tiempo real de un jarabe funcional tratado a diferentes presiones y sometido a estudio de estabilidad (24 meses, 25°C y 60% HR).

Tiempo	0,1 MPa	80 MPa	120 MPa
<b>Fin tratamiento (0 d)</b>	20,27	0,40	2,27
<b>Fin conservación (24 meses)</b>	65,22	45,25	45,73
<b>Total</b>	85,48	45,65	48,00



**Figura 1.** Contenido en hierro de un jarabe funcional tratado a diferentes presiones y sometido a estudio de estabilidad a tiempo real (25°C ± 2° C y 60 ± 5% HR) o condiciones aceleradas (40° C ± 2 ° C y 75 ± 5% HR).



**Figura 2.** Contenido en vitamina C de un jarabe funcional tratado a diferentes presiones y sometido a estudio de estabilidad a tiempo real ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $60 \pm 5\%$  HR) o condiciones aceleradas ( $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $75 \pm 5\%$  HR).

# SESIÓN II



## Biotecnología Agroalimentaria

# RESÚMENES

## Patrones de expresión de sistemas antioxidantes en plantas pioneras presentes en balsas de estériles contaminadas con altas concentraciones de metales pesados

A. López-Orenes, M.A. Ferrer, A.A. Calderón

Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria. Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena, España. [antonio.orenes@upct.es](mailto:antonio.orenes@upct.es)

### RESUMEN

Las zonas contaminadas por la acción minera causan graves problemas medioambientales, en especial las balsas de estériles mineros por sus altas concentraciones de metales pesados y su susceptibilidad a ser erosionadas por agentes ambientales. El estudio de la fisiología de las plantas que crecen de forma espontánea en estas zonas degradadas, puede constituir una herramienta de gran importancia a la hora de plantear técnicas de restauración de las balsas de estériles mineros más eficaces. *Zygophyllum fabago* es una de las especies que se encuentran, habitualmente, en las balsas de estériles mineros de la Sierra de Cartagena. Presenta una alta tolerancia a niveles elevados de metales pesados y una buena adaptación a las condiciones edafo-climáticas de la zona, lo que le permite ser de las primeras especies en colonizar dichos espacios, mejorando las condiciones del suelo para que otras especies puedan establecerse con posterioridad. En este trabajo se analizan los niveles de algunos componentes del sistema antioxidante y la capacidad antioxidante de plantas de *Z. fabago* pertenecientes a tres poblaciones de la Sierra de Cartagena, dos de las cuales procedentes de sendas balsas de estériles. Los resultados obtenidos mostraron que las plantas crecidas en las balsas presentaron niveles superiores de los parámetros citados, sugiriendo que el carácter de planta pionera de *Zygophyllum* puede estar relacionado con la activación de un robusto sistema antioxidante que minimice el daño oxidativo provocado por las condiciones desfavorables de crecimiento.

**Palabras clave:** *Zygophyllum fabago*; capacidad antioxidante; tolerancia al estrés

### 1. Introducción

La contaminación ambiental por metales pesados (MP) está aumentando de forma alarmante como consecuencia del incremento del desarrollo industrial y de la agricultura intensiva. El aumento de los MP en el medio junto con su elevada persistencia, favorecen su bioacumulación a lo largo de la cadena trófica, pudiendo alcanzar concentraciones nocivas para la salud y el equilibrio biológico. Las zonas mineras y en concreto las balsas de estériles mineros presentan niveles muy elevados de MP y son zonas donde conviene reducir la presencia de estos contaminantes, recuperando o restaurando los ecosistemas degradados. Estas balsas de estériles mineros son áreas de difícil restauración mediante el uso de plantas, ya que el establecimiento y supervivencia de las mismas están condicionados por los altos niveles de MP, pH extremos, bajos niveles de nutrientes y baja capacidad de retención de

agua de los suelos [1,2]. No obstante, incluso en estas balsas se observan islas de vegetación [3], lo que sugiere que la revegetación de la zona podría llevarse a cabo, y con ello se podría impedir la erosión del suelo y la consiguiente propagación de MP. A las extremas condiciones edáficas que se presentan en las balsas de estériles mineros hay que sumar que la zona de estudio se localiza en la Sierra de Cartagena, en el SE de España, caracterizada por tener un clima mediterráneo semiárido, con alta temperatura, alta irradiancia y escasez de precipitaciones. Por tanto, las plantas se encuentran sometidas a un alto grado de estrés, especialmente durante los meses de verano. La selección de especies adecuadas, que se puedan establecer, crecer, y colonizar los suelos contaminados con MP, es importante para la remediación exitosa de estas zonas. Durante los últimos 30 años, se han identificado más de 450 especies de plantas hiperacumuladoras entre diferentes taxones [4]. Sin embargo, en la práctica, existe un interés

continuo en la búsqueda de plantas tolerantes nativas o naturalizadas, perfectamente adaptadas al entorno ecológico local, como una estrategia útil para alcanzar niveles aceptables de cobertura vegetal en los procesos de recuperación de suelos [5-7]. Con el fin de lograr la revegetación autosostenible de las zonas degradadas, resulta necesario conocer los mecanismos que determinan la tolerancia de las plantas a las duras condiciones ambientales, lo que permitiría poner en marcha programas de restauración con mayores probabilidades de éxito.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Material vegetal

En el estudio se utilizaron hojas completamente expandidas de plantas de *Zygophyllum fabago* crecidas de forma espontánea en tres localizaciones de la Sierra de Cartagena. Dos de las poblaciones analizadas procedieron de sendas balsas de estériles mineros (denominadas “Agustin” y “Mercader”) y la tercera de una zona localizada a 1 km de distancia de las anteriores y con niveles de metales pesados significativamente inferiores a los de las balsas (ZNA, Tabla 1). Las muestras se recolectaron en primavera y se transportaron al laboratorio, refrigeradas, en el menor tiempo posible. Una vez allí se lavaron bien con agua destilada, se secaron suavemente sobre papel de filtro, se congelaron y pulverizaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80° C hasta su análisis.

### 2.2 Determinación de marcadores de estrés

Los niveles de clorofilas a y b y de carotenoides totales se determinaron de acuerdo con lo descrito en [8]. Como marcadores de estrés oxidativo se midieron los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, radical superóxido, oxidación de proteínas, peroxidación de lípidos y de prolina [8].

### 2.3 Análisis de compuestos antioxidantes y determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se midió mediante tres ensayos espectrofotométricos (métodos del DPPH, ABTS y FRAP), de acuerdo con lo descrito en [8]. Como compuestos antioxidantes se determinó el contenido de fenoles solubles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu, así como los niveles de ácidos hidroxicinámicos, flavonoides totales y flavanoles. También se analizaron los niveles de ácido ascórbico y de tioles totales. Todos los análisis se llevaron a cabo mediante técnicas espectrofotométricas, de acuerdo con lo descrito en [8].

### 2.4. Análisis de sistemas enzimáticos implicados en el metabolismo de compuestos fenólicos

Las actividades enzimáticas fenilalanina amonio liasa (PAL) y guayacol-peroxidasa (PRX) se determinaron espectrofotométricamente [8].

### 2.5. 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 niveles de clorofilas disminuyeron drásticamente en las plantas que crecieron en las balsas de estériles mineros en comparación con las plantas de la zona no afectada (Tabla 2), aunque la relación Chl a/b fue bastante parecida. Esta relación presenta valores relativamente bajos, lo que indicaría que incluso las plantas de la zona no afectada estarían soportando cierto grado de estrés en el momento del muestreo.

La peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas se utilizaron como marcadores de daño oxidativo a macromoléculas. Curiosamente, se observó una marcada disminución en el contenido de estos parámetros en las plantas crecidas en las balsas de estériles en comparación con las de la zona no afectada (Figura 1). Además, los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de radical superóxido fueron significativamente menores en las plantas crecidas en balsas de estériles (Figura 1). En cuanto a la prolina se observó también como en las plantas crecidas en las balsas los niveles descendían considerablemente respecto a las procedentes de la zona no afectada (datos no mostrados).

Con el fin de tener una primera evaluación de la capacidad antioxidante de extractos procedentes de las hojas de *Z. fabago* se llevaron a cabo tres ensayos (DPPH, ABTS y FRAP). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3, en la que se observa que la capacidad antioxidante de los extractos procedentes de las plantas que crecen en las balsas fue mayor, indicando que los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo se encuentran sobreactivados en estas plantas.

En cuanto al contenido fenólico de los extractos se observó que los niveles de fenoles solubles totales fueron superiores en las plantas crecidas

en las balsas de estériles mineros (Tabla 4), al igual que ocurría con los niveles de ácidos hidroxicinámicos, sin embargo los niveles observados de flavonoides y flavanoles fueron similares en todas las muestras (datos no mostrados).

Los niveles de ácido ascórbico fueron también mayores en plantas crecidas en las balsas, al igual que ocurrió con los niveles de tioles totales (Tabla 4). El ascórbico actúa como reductor de muchos radicales libres, minimizando los daños causados por el estrés oxidativo y protegiendo, de esta forma, a las macromoléculas del daño oxidativo. La capacidad para donar electrones en un rango amplio de reacciones enzimáticas y no enzimáticas hace del ácido ascórbico el principal destructor de especies activas del oxígeno (EAO) en fase acuosa. El aumento de los niveles de ascórbico en las plantas crecidas en las balsas de estériles mineros podría indicar que hay una generación continua de dichas EAO. Algo similar ocurriría con el glutatión, que reacciona químicamente con oxígeno singlete, superóxido y radicales hidroxilo, y, por tanto, funciona directamente como un captador de radicales libres. El glutatión tiene un papel central en la defensa antioxidante y, además, tiene la capacidad para regenerar al ácido ascórbico, vía ciclo ascorbato-glutatión.

En cuanto a las enzimas implicadas en el metabolismo fenólico, se observó que la PAL, enzima que cataliza la reacción que convierte L-fenilalanina en ácido trans-cinámico, disminuía en las plantas crecidas en las balsas de estériles (datos no mostrados), esto podría deberse a que al haber un mayor contenido en compuestos fenólicos en dichas plantas, se ralentiza la biosíntesis de estos. En el caso de la PRX soluble, enzima que cataliza la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando  $H_2O_2$  como cosustrato, se observó que los niveles obtenidos en el pantano Agustín fueron similares a los obtenidos en las plantas crecidas fuera de las balsas de estériles, y que los niveles de las plantas crecidas en el pantano Mercader fueron muy superiores a las anteriores (datos no mostrados). Estos resultados indicarían la activación de un mecanismo antioxidante por el cual la PRX oxidaría los compuestos fenólicos utilizando el  $H_2O_2$  como aceptor de electrones, esto a su vez explicaría también el hecho de que los niveles de  $H_2O_2$  en plantas crecidas en las balsas de estériles mineros fueran inferiores, debido a la eficaz respuesta de las plantas de *Z. fabago* para reducir dichas EAO.

#### 4. Conclusiones

*Z. fabago* es una de las especies pioneras en la colonización de las balsas de estériles mineros de la Sierra de Cartagena, gracias, posiblemente, a la activación de un robusto sistema antioxidante. Los análisis realizados muestran claras diferencias entre las plantas crecidas dentro de las balsas de estériles y fuera de este ambiente. Así, en líneas generales, las plantas crecidas en las balsas presentan niveles superiores de compuestos antioxidantes, lo que podría indicar el estrés al que están expuestas en esas condiciones, de ahí que los extractos de dichas plantas tengan mayor capacidad antioxidante para limitar la acumulación de las EAO. Aun así, la inversión de los escasos recursos disponibles en las balsas en la activación del sistema antioxidante, conduciría a la disminución en el contenido en pigmentos fotosintéticos, déficit nutricional y, en suma, a un peor estado fisiológico de la planta. Por el contrario, la sobre-activación de la defensa antioxidante llevaría a una disminución de los niveles de los marcadores de estrés con respecto a las plantas de la zona no afectada (que, posiblemente, también se encontraban sometidas a condiciones sub-óptimas de crecimiento).

#### 5. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el MINECO (Proyecto CTM2011-23958) y por el MECD (beca FPU AP2012/02559). Parte del trabajo se ha realizado en el Instituto de Biotecnología Vegetal de la UPCT.

#### 6. Referencias bibliográficas

- [1] Tordoff GM, AJM Baker, AJ Willis, (2000). Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous mine wastes. *Chemosphere* 41: 219–228.
- [2] Conesa HM, Faz A, Arnaldos R, (2006). Heavy metal accumulation and tolerance in plants from mine tailings 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 MN, Jiménez-Cárceles FJ, Conesa HM, (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] Maestri E, Marmioli M, Visioli G, Marmioli N, (2010). Metal tolerance and

hyperaccumulation: Costs and trade-offs between traits and environment. *Environ. Exp. Bot.* 68: 1–13.

[5] Kirmer A, Tischew S, Ozinga WA, von Lampe M, Baasch A, van Groenendael JM, (2008). Importance of regional species pools and functional traits in colonization processes: predicting re-colonization after large-scale destruction of ecosystems. *J. Appl. Ecol.* 45, 1523e1530.

[6] Chen L, S. Gao, P. Zhu, Y. Liu, T. Hu, J. Zhang. (2013). Comparative study of metal resistance and accumulation of lead and zinc in two poplars. *Physiol Plantarum* doi:10.1111/ppl.12120.

[7] Párraga-Aguado I, González-Alcaraz MN, Álvarez-Rogel J, Jiménez-Cárceles FJ, Conesa HM, (2013b). The importance of edaphic niches and pioneer plant species succession for the phytomanagement of mine tailings. *Environ. Pollut.* 176: 134–143.

[8] López-Orenes A, Martínez-Moreno JM, Calderón AA, Ferrer MA, (2013). Changes in phenolic metabolism in salicylic acid-treated shoots of *Cistus heterophyllus*. *Plant Cell Tiss. Org.* 113: 417-427.

**Tablas y Figuras**

**Tabla 1.** Características de los suelos de las poblaciones estudiadas (Conesa, comunicación personal).

Muestra	ZNA	Agustin	Mercader
pH	7.83	7.17	7.21
%CaCO <sub>3</sub>	24.56	10.75	8.62
EC (ds/m)	1.75	2.65	3.46
CO (%)	3.18	0.71	0.57
DOC (mg/kg)	400.33	31.95	18.13
N total (g/kg)	4.29	0.30	0.24
As (mg/kg)	14.75	190.00	414.33
Cd (mg/kg)	8.00	45.33	22.67
Cu (mg/kg)	46.70	69.83	89.67
Mn (mg/kg)	702.75	7923.67	12084.67
Pb (mg/kg)	646.75	3438.67	2620.00
Zn (mg/kg)	546.75	5368.33	3517.33

**Tabla 2.** Contenido en Clorofilas (µg compuesto/g PF) (P < 0,05)

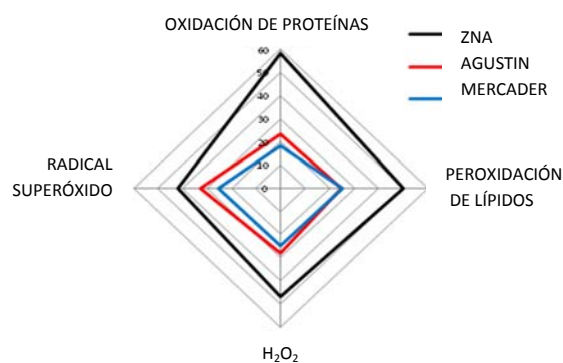
Muestra	Chl a	Chl b
ZNA	892.24 <sup>a</sup>	701.39 <sup>a</sup>
Agustin	665.05 <sup>b</sup>	657.22 <sup>b</sup>
Mercader	461.84 <sup>c</sup>	357.94 <sup>c</sup>

**Tabla 3.** Capacidad antioxidante (P < 0,05)

Muestra	DPPH µmol eq. ácido gálico /g PF	ABTS µmol /g PF	FRAP µmol Fe (II) /g PF
ZNA	2.00 <sup>c</sup>	0.63 <sup>c</sup>	9.66 <sup>c</sup>
Agustin	3.44 <sup>a</sup>	1.30 <sup>a</sup>	16.65 <sup>a</sup>
Mercader	2.78 <sup>b</sup>	1.06 <sup>b</sup>	14.23 <sup>b</sup>

**Tabla 4.** Compuestos antioxidantes (P < 0,05)

Muestra	Fenoles µmol eq. ácido gálico /g PF	Ascórbico µmol /g PF	Tioles µmol /g PF
ZNA	1.34 <sup>c</sup>	1.84 <sup>c</sup>	299.48 <sup>c</sup>
Agustin	2.72 <sup>a</sup>	3.14 <sup>a</sup>	410.41 <sup>a</sup>
Mercader	2.11 <sup>b</sup>	2.68 <sup>b</sup>	378.86 <sup>b</sup>



**Figura 1.** Niveles de diferentes marcadores de estrés: oxidación de proteínas (nmol de hidrazona/g PF), radical superóxido (nmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/g PF), peroxidación de lípidos (nmol MDA/g PF) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (nmol/g PF) expresados como porcentaje de la suma total.

## **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 del género**

**A. Martínez-Bas**<sup>(1)(3)</sup>, E. Armero<sup>(1)</sup>, M. Kessler<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria, Universidad Politécnica de Cartagena. anamartinezbas@hotmail.com

<sup>(2)</sup> Departamento de Matemática Aplicada y Estadística, Universidad Politécnica de Cartagena.

### **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. En el estudio de la línea genética, observamos que la línea Ebro presentó mejores caracteres de crecimiento sobre todo por su mejor capacidad de transformación del pienso en carne. La línea Hyla se reveló como una línea con menor ritmo de crecimiento. En cuanto a la conveniencia de la utilización de un pienso más energético y menos fibroso, se observó que mejoraba el índice de transformación. Las hembras presentaron muy buenas características de crecimiento, con menor índice de transformación que los machos. Finalmente, el momento óptimo al sacrificio resultó las 12 semanas de edad, si bien este resultado depende del precio del pienso y de la carne. La combinación más rentable fue la línea Ebro alimentada con el pienso más energético. Si bien, puede buscarse alguna de las características concretas de alguna de las otras líneas que las valore, y otras características todavía no analizadas pueden tener que ser consideradas.

**Palabras clave:** línea genética, dieta, crecimiento, eficiencia alimentaria

### **1. Introducción**

En la producción comercial de conejo, los costes de alimentación representan alrededor del 70 % de la producción de carne de conejo (Al-Dobaib, S.N., 2010). Así en ocasiones, los costes de producción superan a los costes de venta del kilo de carne; lo que hace inviable el sistema. Por ello, es necesario buscar alternativas que hagan rentable la producción.

En un esquema clásico de selección de conejos, la velocidad de crecimiento es el principal criterio de selección. Pero el principal objetivo es mejorar la eficiencia alimentaria. Según Armero y Blasco, 1992, la eficiencia alimentaria es una característica con mayor valor económico que la ganancia de peso diaria. En nuestro estudio 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. Por tanto, El objetivo

general del proyecto es 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 HYL. Y se estudió la influencia del género: se engordaron tanto machos como hembras.

### **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. Además se pesó el pienso consumido por comedero. Con estos datos se han calculado los siguientes parámetros: Índice de transformación. Es el ratio entre los kilogramos de pienso respecto a los kilogramos de carne.

Velocidad de crecimiento. Evolución del peso en kilogramos desde el destete hasta el momento del sacrificio (entre 8 y 16 semanas de edad).

## 2.4. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados con el procedimiento GLM (R Statistical, 2009), a partir del cual se obtuvieron las medias mínimo cuadráticas.

El modelo estadístico fue:

$$Y = \mu + LG + D + G + t + LG*t + D*t + G*t + e$$

Y = variable dependiente

$\mu$  = media global

LG = Línea Genética (3 líneas = Ebro, Grimaud e Hyla)

D = Dieta (2 Dietas = Dieta A; Dieta B)

G = Género (1 macho; 2 hembra)

t = edad en semanas (8 - 16)

LG\*t = efecto de la interacción entre Línea Genética y tiempo

D\*t = efecto de la interacción entre Dieta y tiempo

G\*t = Efecto de la interacción entre Género y tiempo

e = error aleatorio

## 3. Resultados y Discusión

El efecto de la línea genética para caracteres de crecimiento dio como resultado que el peso de la línea HY se mantuvo por debajo a lo largo de todas las semanas analizadas. Este resultado era esperable dado que la línea HY es una línea de aptitud maternal que no ha sido seleccionada por crecimiento, mientras que las líneas EB y GR han sido seleccionadas a favor de caracteres de crecimiento. Al final del ensayo la línea HY alcanzó un peso aproximado de 2800 gramos, mientras que las líneas GR y EB alcanzaron 3100 gramos (tabla 2).

Por otro lado, en la tabla 3, se observa que el índice de transformación osciló desde 3.68 en la

semana 8 hasta 6.91 en la semana 16; además la línea que obtuvo un mejor IT fue la EB. Respecto al efecto del tipo de alimentación, no se ha observado un efecto del tipo de pienso sobre el ritmo de crecimiento, sin embargo los conejos alimentados con el pienso más energético presentaron un mejor índice de transformación (tabla 3) siendo aproximadamente 0,5 menor con el pienso más energético (pienso B).

Por otro lado, el efecto del género para caracteres de crecimiento en la evolución del peso fue muy parecido entre machos y hembras, si bien al final las hembras pesaron ligeramente más que los machos (tabla 2). Al igual que Lazzaroni et al., (2009) que también encontraron pequeñas diferencias entre machos y hembras en todos los parámetros productivos; así las hembras tuvieron una ganancia de peso diaria a las 16 semanas superior a los machos. Respecto al IT tendió a ser más elevado en los machos (hasta 0.57 mayor en la semana 13), y esta diferencia fue incrementando en el tiempo como podemos comprobar en la tabla 3.

## 4. Conclusiones

Respecto a los caracteres de crecimiento hemos observado que las líneas de aptitud cárnica, Ebro y Grimaud, alcanzaron un peso final superior que la línea de aptitud maternal, Hyla. Por otro lado, no hubo diferencias en la evolución del peso para los dos tipos de pienso ensayados, ni entre machos y hembras.

El índice de transformación fue una de las variables más afectadas por la línea genética, tipo de alimentación y género. Así, el índice de transformación fue inferior para la línea Ebro (-0,5 inferior que GR e HY), para el pienso B (-0,5 inferior que para el pienso A) y para las hembras (-0,3 inferior que para los machos).

## 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, Marta y Emperatriz. Así como a mis directores de tesis.

**6. Referencias bibliográficas**

[1] Al-Donaib, S.N. 2010. Effect of diets on growth, digestibility, carcass and meat quality characteristics of four rabbit breeds. Saudi Journal of Biological Sciences. 17: 83-93.  
 [2] Armero, Q. Blasco, A. 1992. Economic weights for rabbits selection índices. V Congress of World Science Rabbit Association. Corvalis, OR. 25-30 Julio.

[3] R Statistical (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2009), paquete lm (Linear Model).  
 [4] Lazzaroni, C., et al. 2009. Different rearing systems for fattening rabbits: Performance and carcass characteristics. Meat Science. 82: 200-204.

**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.** Evolución del incremento de peso (kilogramos) en función de la LG, la formulación de la dieta y el género.

Semana	LG						Pienso				Género			
	EB		GR		HY		A		B		1		2	
	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE
8	49,2 <sup>a</sup>	1,1	49,1 <sup>a</sup>	0,9	43,5 <sup>b</sup>	0,9	46,1 <sup>a</sup>	0,8	49,5 <sup>b</sup>	0,8	48,3	0,7	47,2	0,7
9	50,1 <sup>a</sup>	1,1	49,3 <sup>a</sup>	0,9	42,4 <sup>b</sup>	1,0	45,9	0,8	48,2	0,8	48,5	0,7	46,4	0,7
10	44,2 <sup>a</sup>	0,9	44,2 <sup>a</sup>	1,1	35,2 <sup>b</sup>	1,0	40,4	0,9	43,3	1,0	41,8	0,8	42,2	0,8
11	43,2 <sup>a</sup>	0,9	41,2 <sup>a</sup>	1,1	31,2 <sup>b</sup>	1,1	39,4	0,8	39,7	1,0	38,9	0,8	40,2	0,9
12	38,1 <sup>a</sup>	0,9	38,4 <sup>a</sup>	1,0	30,3 <sup>b</sup>	0,8	35,2	0,9	36,4	1,0	39,8	0,9	36,3	0,9
13	35,4 <sup>a</sup>	0,8	34,5 <sup>a</sup>	0,9	26,9 <sup>b</sup>	0,9	33,1	1,0	32,7	1,1	30,7	0,9	35,4	0,9
14	33,2 <sup>a</sup>	1,0	32,4 <sup>a</sup>	1,1	28,1 <sup>b</sup>	0,9	30,8	1,0	30,9	1,1	29,9	1,0	32,1	1,0
15	34,2 <sup>a</sup>	1,1	31,3 <sup>ab</sup>	1,2	27,9 <sup>b</sup>	1,2	30,1	1,2	32,1	1,2	28,4 <sup>a</sup>	1,2	33,4 <sup>b</sup>	1,2
16	31,2 <sup>a</sup>	1,2	31,2 <sup>a</sup>	1,2	28,9 <sup>b</sup>	1,3	27,8	1,1	32,4	1,2	26,4	1,3	31,4	1,2

<sup>1</sup>.LSM: Medias Mínimo Cuadráticas, SE: Estándar Error

**Tabla 3.** Evolución del IT en función de la LG, la formulación de la dieta y el género.

Semana	LG						Pienso				Género			
	EB		GR		HY		A		B		1		2	
	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE
8	3,54 <sup>a</sup>	0,06	3,66 <sup>ab</sup>	0,07	3,84 <sup>b</sup>	0,06	3,52 <sup>a</sup>	0,05	3,83 <sup>b</sup>	0,06	3,66	0,05	3,69	0,05
9	3,34	0,06	3,65	0,06	3,71	0,06	3,48	0,05	3,65	0,05	3,50	0,05	3,63	0,05
10	4,04 <sup>a</sup>	0,08	4,16 <sup>b</sup>	0,08	4,48 <sup>c</sup>	0,07	4,17	0,07	4,28	0,06	4,25	0,07	4,20	0,06
11	4,43	0,08	4,82	0,10	4,9	0,10	4,53 <sup>a</sup>	0,08	4,90 <sup>b</sup>	0,08	4,79	0,08	4,65	0,08
12	5,39	0,12	5,46	0,12	5,73	0,11	5,51	0,11	5,53	0,08	5,52	0,08	5,51	0,11
13	6,14	0,15	6,58	0,17	6,49	0,14	6,18	0,13	6,59	0,12	6,7 <sup>a</sup>	0,13	6,13 <sup>b</sup>	0,12
14	6,38	0,24	7,02	0,25	6,77	0,16	6,79	0,16	6,64	0,21	7,01	0,17	6,47	0,18
15	6,4	0,30	6,97	0,30	7,51	0,26	7,16	0,22	6,77	0,27	7,57	0,28	6,58	0,19
16	7,03 <sup>a</sup>	0,27	6,72 <sup>ab</sup>	0,55	7,00 <sup>b</sup>	0,35	6,92	0,22	6,97	0,51	7,53	0,21	6,53	0,31

<sup>1</sup> LSM: Medias Mínimo Cuadráticas, SE: Estándar Error

## “Itumxix”: la nueva variedad blanca tardía de uva de mesa

M. Torne, J. Carreño

IMIDA, Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario, C/ Mayor, s/n, 30150 La Alberca, Murcia. España. manuel.tornel@carm.es

### RESUMEN

“Itumsix” es una nueva variedad uva de mesa obtenida en Murcia, por el Departamento de Viticultura del IMIDA y el Convenio con ITUM, S.L. Destaca por ser una uva apirena de maduración tardía, conservándose los racimos muy bien en la planta hasta mediados de diciembre; presenta una buena y constante productividad con racimos de tamaño medio-grande ligeramente compactos. Las bayas de forma elíptica larga, color blanco uniforme y sabor neutro, presentan una textura crujiente muy apreciada por los consumidores.

**Palabras clave:** Vitis vinífera, apirena, textura

### 1. Origen

“Itumsix” (Fig. 1), es el resultado de tres generaciones de cruzamientos realizados por el Equipo de Uva de Mesa perteneciente al Departamento de Viticultura del IMIDA y el Convenio con ITUM, S.L.; que comenzaron en 1992 utilizando como parental femenino la variedad Dominga, autóctona de nuestra región; la uva Dominga es blanca con semillas, bayas de textura media y sabor neutro, los racimos son muy grandes pesando alrededor de 1 kg., forma cilindro-cónica y ligeramente compactos.

El cruzamiento se realizó en 2007, consistiendo en emasculas las flores de 30 racimos de la planta madre 02-12-97 que se polinizaron con la variedad apirena Princess, obteniéndose 5.840 semillas, el cruce se denominó “07-362”; en 2008 se plantaron en la finca de ITUM, Blanca (Murcia), las 3.170 plantas que germinaron. Tres híbridos del cruce 07-362 se seleccionaron al obtener las primeras uvas en 2009, todos ellos de uva apirena blanca crujiente, y se injertaron sobre patrón 1103-Paulsen en la parcela de estudio agronómico en 2010.

Destacó el híbrido con código “07-362-1”, confirmándose en 2011 la excelente calidad de la uva, en el tercer año de producción en planta madre y el primero en plantas injertadas; tras la campaña 2012 en que se mantiene la productividad y buena calidad de racimos, se registra el híbrido con el nombre “Itumsix”.

La temporada pasada, año 2013, tras plantarse en distintas zonas de la Región de Murcia de forma experimental en las fincas de los socios de ITUM, S.L., se confirma la buena calidad de esta variedad en cuanto a producción, calidad de

racimos y buena conservación en planta, por lo que la hace muy interesante como variedad muy tardía.

### 2. Descripción

La planta de uva Itumsix es de vigor medio-alto, presentando una buena y constante productividad, medida con el índice de fertilidad (Tabla 1), que nos indica el número de uvas que lleva cada sarmiento brotado siendo la media de los cinco años de producción de 1,1 uvas por sarmiento.

**Tabla 1.** Datos de textura de las bayas e índice de fertilidad

Año	Textura (N)	Índice Fertilidad
2009	21,8	0,8
2010	19,7	1,1
2011	22,5	1
2012	21,7	1,2
2013	23,4	1,1

Es variedad de pocos zarcillos y los que tiene son sencillos; las yemas son pequeñas y algodonosas. Las hojas son lisas de color verde oscuro, sin vello, con los senos peciolares ligeramente superpuestos, de tamaño medio y pedúnculo rojo-verdoso (Fig. 2).

Los racimos suelen nacer entre la tercera y quinta yema, son de tamaño medio-grande con un peso de unos 700 g/racimo, ligeramente compactos y forma cónica.

Los granos tienen forma elíptica alargada, color blanco uniforme y sabor neutro alcanzando a su madurez los 16-18º Brix de azúcar. En cuanto al calibre, medido el diámetro ecuatorial de las bayas, de forma natural varía entre 16-18 mm, alcanzando tras los tratamientos con ácido giberélico y el anillado un calibre entre 19-21 mm.

Itumsix presenta bayas con pulpa firme que le confiere una textura crujiente o crocante, muy apreciadas por el consumidor, además de aguantar mejor la manipulación, el transporte y todo el proceso de comercialización. Para medir la firmeza de la pulpa utilizamos un analizador de textura de alimentos que mide la presión necesaria (N) para deformar la baya en un porcentaje de su diámetro ecuatorial; Itumsix presenta una textura media de las bayas de 21,8 N de fuerza, valor similar a Crimson Seedless (Tabla 1). Al ser una variedad crujiente, presenta una zona subepidérmica en forma de anillo de color blanquecino con mucha consistencia (Fig. 3).

Se conservó bien en cámara frigorífica con generador de sulfuroso durante dos meses sin pardeamientos en bayas.

### 3. Técnicas de cultivo

#### 3.1 Ácido giberélico: aclareo

Itumsix es una variedad ligeramente compacta, por ello necesitamos aplicar ácido giberélico en floración para disminuir el porcentaje de cuajado y por tanto el número de bayas que quedan en el racimo. Ello permite que, al quedar menos bayas, se aumente el tamaño de las mismas y que no se compacte el racimo. Tras ensayar diferentes dosis, con aplicaciones entre 0,8-1,5 ppm los racimos quedaron con un buen cuaje, dependiendo la dosis de la climatología en el momento de la aplicación (temperatura, humedad, lluvia) y de las condiciones de cultivo.

#### 3.2 Ácido giberélico: engorde

En función de los factores climáticos, alrededor de 4 ppm es la dosis de ácido giberélico aplicado una vez finalizado el cuajado de las flores, y cuando ha terminado la caída de bayas y comienza el crecimiento rápido de las mismas (con diámetro de bayas de 4-6 mm) produciendo un aumento de tamaño de las bayas; se realizan dos aplicaciones a la misma dosis con una semana de intervalo.

No se ha observado descenso en la fertilidad de las yemas para la cosecha siguiente tras mojar la vegetación al aplicarle ácido giberélico.

#### 3.3 Incisión anular

El anillado o incisión anular consiste en quitar un anillo de 5 mm de ancho de corteza, del cambium hacia fuera, que contiene el floema con los vasos cribosos que transportan la savia elaborada. Con ello se interrumpe durante unos 10-15 días el transporte de nutrientes elaborados (azúcares, hormonas etc.) del anillo hacia abajo, concentrándose en la parte aérea de la planta y produciendo un incremento en el tamaño de las bayas de un 10 a 15 %. Esta operación se realiza en la uva Itumsix coincidiendo con el primer tratamiento de ácido giberélico para engorde de bayas.

#### 3.4 Despunte de racimos

Itumsix produce algunos racimos demasiado largos, por lo que conviene despuntarlos, que consiste en cortar con tijeras al racimo un trozo del extremo.

### 4. Referencias bibliográficas

2<sup>nd</sup> Edition of the OIV descriptor list for grape varieties and Vitis species. OIV 2001

CARREÑO, J.; ONCINA, R.; TORNEL, M.; CARREÑO, I. 2005. Obtención de nuevas variedades de uva de mesa mediante el cultivo in vitro de embriones. Optimización de la aclimatación de plantas. Agrícola Vergel. 283: 332-338



**Figura 1.** Racimo de uva Itumsix



**Figura 2.** *Detalle de hoja con pedúnculo*



**Figura 3.** *Detalle de baya, corte transversal y longitudinal*

## Quantitative evaluation of bias in barcode markers derived from complex samples

M. Pawluczyk<sup>(1)</sup>, J. Weiss<sup>(1)</sup>, Matthew G. Links<sup>(2)</sup>, M. E. Aranguren<sup>(3)</sup>, M. D. Wilkinson<sup>(3)</sup>, M. Egea-Cortines<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Dirección Genetics, Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, 30202, Cartagena, España. marta.pawluczyk@gmail.com

<sup>(2)</sup> Department of Computer Science, University of Saskatchewan, Saskatoon Research Centre, 107 Science Place Saskatoon, SK, S7N 0X2, Canada

<sup>(3)</sup> Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas UPM-INIA (CBGP), Campus Montegancedo, Autopista M-40 (Km 38), 28223-Pozuelo de Alarcón Madrid, España

### ABSTRACT

PCR products have become a major commodity used to identify organisms based on polymorphism at the DNA level. One problem arising is that unbiased identification of organisms takes as working hypothesis that when DNA is extracted from a sample, a positive signal will be obtained if universal primers are used and DNA quality is suitable for PCR. As this assumption is not always correct we used a system where large differences in PCR success have been described to identify where biases appear and maybe identify solutions. Plants can be identified with at least seven independent plastid-located loci. These differ in their degree of PCR success and how informative they are in terms of taxonomically useful sequence polymorphisms. Here we used six common plastid loci spanning 48 plant species and performed a quantitative analysis of bias at each step of the identification process. As expected we found important differences in PCR efficiency within a single species, depending on the barcoding sequence being amplified. Quantitative PCR revealed that the Ct threshold for various plastid loci, even within a single species, could exhibit greater than 2000-fold differences in DNA quantity after amplification. We then performed Next Generation Sequencing experiments in nine species using equal quantities of three plastid-based primers and equally-mixed quantities of DNA from multiple species. The result was significantly biased towards species and specific loci even when using adaptor-specific primers. Our results caution that Next-Generation Sequencing projects may suffer dramatic bias, arising largely during DNA amplification steps. Moreover, that amplification-based Next Generation Sequencing technologies exhibit additional bias despite using adaptor-specific primers, indicating that amplification success depends on the DNA fragment. As such, while qualitative analysis of unknown samples are prone to false negative results if a combination of widely-successful amplicons are not used, quantitative results should be considered highly suspect, even if all species in the starting sample are known.

**Keywords:** meta-barcoding, Next Generation Sequencing, Ion torrent, PCR efficiency

### 1. Introduction

DNA barcoding is an important tool in taxonomic discrimination basing on universal DNA sequences [1]. These are using in monitoring species distribution in biodiversity studies and biodiversity conservation. The barcoding approach has become a mainstream technique to identify species in insects [2], very closely related plant species or hybrids [3] and bacteria [4].

In plants it is not easy to find a single locus that can be used as an efficient barcode as it is in animals or bacteria. Until now the most

promising candidate markers are *matK* [5] and the combination of *trnH-psbA* and *rbcL1* [6].

Identification of environmental samples comprising more than one species is very difficult, especially when this kind of analysis aim to arrive at a quantitative measure of the relative abundance of the various species in the sample.

There are different types of biases that can influence results of identification. Some of them as DNA extraction efficiency, chloroplast copy number [7], etc. However some other sources of bias can be used to improve experimental

approach for a given sample, and/or better normalize the outcomes.

These biases fall into three categories: differential barcode amplification success as a result of the barcode's universal primers, the efficiency of the amplification reaction, which may differ from species to species based on the sequence composition of their specific variant of the barcode and biases introduced during the preparation of DNA libraries for sequencing.

By quantifying these biases and relating them to the specific sequences being studied, it may be possible to formulate approaches for post facto normalization of data to better-reflect the population make-up.

The present study, therefore, aims to first quantitatively analyze PCR success and evaluate amplification efficiency and Ct values as a tool for predicting amplification success of specific barcoding markers. In this study, we undertake a survey of six well-known plant barcoding markers and apply them to 48 species from 34 different plant families. In addition, we apply the Ion Torrent sequencing method simultaneously for mixed species PCR products of three barcoding primers *rbcl*, *rpoB* and *rpoC1* starting with equal amounts of PCR products, to quantitatively measure the bias introduced by this step of the metabarcoding study.

## 2. Materials y Methods

**2.1 Plant material, DNA extraction and real-time PCR** Plant material was gathered from the local fruit market, field sampling, botanical records and our own collections. Fresh leaf material from 48 plant species belonging to 33 different families was used for further analysis. Two independent total genomic DNA samples were extracted from fresh leaf using the commercial kit 'Plant NucleoSpin' (Machery and Nagel, Düren, Germany). Single species reactions were performed from the two independent DNA extractions with three technical replicas for a total of six PCR reactions per species using 100 ng/reaction. Real-time PCR reactions were performed with the Mx3000P QPCR System using the SYBR Premix ExTaq™ (Takara Biotechnology, Dalian, China) with ROX as a reference dye.

Equal amounts of genomic DNA from three species were used to create the mixed-species templates. Amplifications were performed using the same protocol described above, except that the initial DNA quantity was 150 ng corresponding to 50ng of each of the three

genomes. Sequencing reactions comprised nine species.

### 2.3. qPCR efficiency

qPCR efficiency was computed using qpcR, R package. Efficiency value (E) was calculated as  $E_{cpD2} = F(cpD2)/F(cpD2)-1$ , in which F is raw fluorescence at cycle x, and cpD2 is cycle number at second derivative maximum of the curve [8].

### 2.4. Determination of relative abundance of sequences from PCR products of mixed genomic DNA by semiconductor sequencing

PCR products generated by amplifying, separately, the chloroplast barcoding sequences *rbcl*-a, *rpoC1* and *rpoB* from mixed genomic DNAs (100 ng each) were pooled equivalently to yield a final amount of 100ng. Initial time of digestion was adjusted to yield 300 bp fragments. Preparation of samples for library construction and sequencing were performed using the Ion Torrent Next generation sequencing Kits (Life Technologies, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. A total of 333,274 reads with a mean read length of 159bp were computationally analyzed in order to identify species origin of each fragment. Such analysis was performed by aligning the reads with a library of known Chloroplast sequences using Bowtie2 [9], and then extracting from the resulting SAM file a map of reads to the known chloroplast sequences, using a Perl script from the mPuma pipeline [10].

## 3. Results and Discussion

Our first analysis was geared towards an assessment of PCR success. As expected, it varied both between barcode markers, and between the 48 plant species tested. Barcode primers for the *matK* gene were the least successful, giving positive results in only 50% of the tested species, followed by *rbcl* which amplified in 82% of species. The *rpoB* and *rpoC1* genes as well as the short intergenic spacers *trnL -F* and *trnH - psbA* proved to be the most universally successful barcoding markers, amplifying in close to 90% of the investigated species (Fig.1). Thus, although *matK* is highly informative in its ability to discriminate between related taxa, it could cause major biases.

The second phase of the analysis addressed whether end point PCR results are the outcome of PCR efficiency. As shown in Fig. 2, amplification efficiency during qPCR varied between barcode markers. The highest average efficiency, based



on amplification from all species, corresponded to the markers *trnL-F* and *trnH-psbA* followed by *rpoB*, *rpoC1* and *rbcl*. The *matK* barcode showed the lowest average efficiency among all species. The efficiencies of *matK*, *rbcl* and *rpoC1*, but not *rpoB* and *trnH-psbA*, were significantly different from high-efficiency marker *trnL-F* ( $p < 0.0001$  for *matK* and *rbcl* and  $p = 0.0013$  for *rpoC1*).

Differences in efficiency may be related to amplification bias among template DNAs in environmental samples. We analyzed abundance of reads after sequencing in order to address this question.

The identification of genomic DNAs corresponding to different organisms in environmental samples requires sequencing of barcode-PCR products. The result of simultaneous sequencing of equal amounts of PCR products from mixed species templates amplified with barcode markers, *rbcl*, *rpoB* and *rpoC1* reveal a strong bias in the number of reads corresponding to each species contained in the equimolar starting sample. In the case of marker *rpoB*, most reads (95%) corresponded to *Solanum tuberosum* and only 0.02 to *Zea mays*.

Analysis of read numbers also showed a strong bias in the number of total reads corresponding to each of the marker. Although equal amounts of PCR product from pre-amplification were used to create the amplicon library, only 11.2% of all reads were identified as *rbcl* fragments, 36.5% as *rpoB* fragments and 52.3% as *rpoC1* fragments. These results are significantly different from an expected 33.3% per reaction (Chi-square test  $p < 2.2 \times 10^{-16}$ ).

This work aimed to reveal and quantify the biases that can occur during metabarcoding analyses. We executed our analyses using the most widely-accepted plant universal markers, quantitated our results using widely-accepted practices such as qPCR, and followed normal protocols for library construction and Next-generation sequencing. At each stage, we re-normalized the samples such that we knew the precise quantities and relative abundances of the input DNA.

Similarity between primer and template [11], as well as the regional G+C content of a template, are factors that influence PCR efficiency [12]. The low PCR success, particularly in case of *matK* with 50% PCR failure in a screening of 48 species, is probably due to lack of similarity between primer and template, since no highly conserved sites flanking the most variable parts of this marker exist [6].

Late development towards short barcodes [13] certainly improve the current situation, but false negatives still remain an issue. Furthermore, even an experimental design geared towards qualitative identification of an environmental sample of unknown composition could exhibit numerous false negative results unless multiple barcode markers are used.

#### 4. Conclusions

Our results reveal that quantitative and even qualitative interpretation of metabarcoding data based on read-abundance is fraught with potential, serious biases. We present, in detail, a dissection of the degree of bias introduced at each step in the typical laboratory practice of sequence analysis from environmental DNA samples. Careful consideration of pre-amplification and sequencing methods might minimize these biases, though we suggest that they cannot be completely overcome using current barcoding technologies relying strongly on PCR amplification.

#### 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] Hajibabaei M, Singer GAC, Hebert PDN, Hickey DA (2007) DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics*, 23, 167–172
- [2] Burns JM, Janzen DH, Hajibabaei M, Hallwachs W, Hebert PDN (2008) DNA barcodes and cryptic species of skipper butterflies in the genus *Perichares* in Area de Conservacion Guanacaste, Costa Rica. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 6350–6355
- [3] Pawluczyk M, Weiss J, Vicente-Colomer MJ, Egea-Cortines M (2012) Two alleles of *rpoB* and *rpoC1* distinguish an endemic European population from *Cistus heterophyllus* and its putative hybrid (*C. x clausonis*) with *C. albidus*. *Plant Systematics and Evolution*, 298, 409–419
- [4] Links MG, Dumonceaux TJ, Hemmingsen SM, Hill JE (2012) The chaperonin-60 universal target is a barcode for bacteria that enables de novo assembly of metagenomic sequence data. *PLoS one*, 7, e49755

[5] Hollingsworth PM, Forrest LL, Spouge JL et al. (2009) A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 12794–12797

[6] Kress WJ, Erickson DL (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

[7] Rowan BA, Bendich AJ (2009) The loss of DNA from chloroplasts as leaves mature: fact or artefact? *Journal of experimental botany*, 60, 3005–10

[8] Spiess A-N, Feig C, Ritz C (2008) Highly accurate sigmoidal fitting of real-time PCR data by introducing a parameter for asymmetry. *BMC bioinformatics*, 9, 221

[9] Langmead B, Salzberg SL (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*, 9, 357–9

[10] Links MG, Chaban B, Hemmingsen SM, Muirhead K, Hill JE (2013) mPUMA: a computational approach to microbiota analysis by de novo assembly of operational taxonomic units based on protein-coding barcode sequences. *Microbiome*, 1, 23

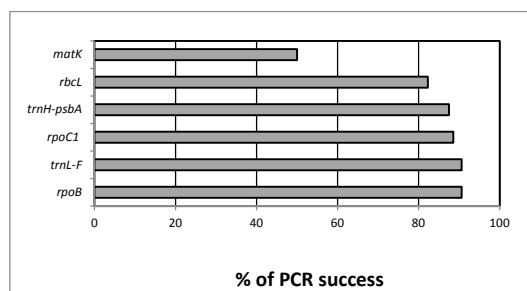
[11] Mann T, Humbert R, Dorschner M, Stamatoyannopoulos J, Noble WS (2009) A thermodynamic approach to PCR primer design. *Nucleic acids research*, 37, e95

[12] Suzuki M, Giovannoni S (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of

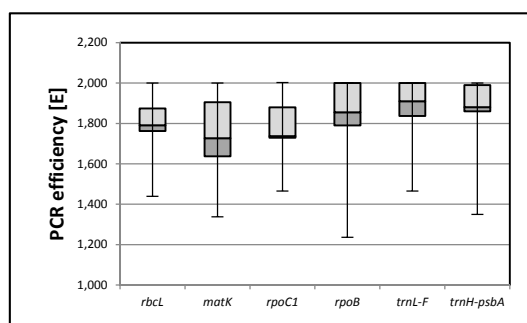
mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 625–630

[13] Taberlet P, Coissac E, Pompanon F et al. (2007) Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Res*, 35, e14

### Tables and Figures



**Figure 1.** Percent PCR success of six barcoding markers in a survey of 48 plant species



**Figure 2.** Boxplot of PCR efficiency data for six barcoding markers derived from qPCRs of 48 plant species. The graphic shows only successful amplification data with an efficiency > 1

## ‘SIROCO 5 ®’ El primer paraguayo en el mercado

A. Carrillo-Navarro, A. Guevara-Gazquez, J. Cos-Terrer

Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA)  
Calle Mayor S/N, 30.150, La Alberca (MURCIA)  
antonio.carrillo4@carm.es

### RESUMEN

Siroco 5® es una nueva variedad de paraguayo o melocotón de forma plana para el mercado de consumo en fresco, que aporta como principales características las bajas necesidades de frío invernal y una fecha de recolección muy temprana. Esto lo convierten en la primera variedad de paraguayo que aparece en el mercado, y que además se puede cultivar en zonas más cercanas a la costa con menos frío invernal, que permite tener unos precios muy interesantes para el productor. Destacan sus características organolépticas de baja acidez y elevados °Brix, que confieren a la fruta una gran aceptación por el consumidor.

**Palabras clave:** *Prunus persica*; breeding; Low chilling; Flat shape.

### 1. Origen.

El cruzamiento que originó la variedad se realizó en 2008, obteniendo los primeros frutos en campo sobre el árbol original en 2010 en la Hoya del Campo (Abarán). Ese mismo año se injertaron algunos árboles sobre patrón Garnem® (GxN 15), sobre los que se han evaluado las características principales en años sucesivos. En 2012 se realizan las primeras plantaciones comerciales en diversos lugares de Murcia, sobre las que también se tomaron algunos datos.

### 2. Descripción.

Siroco 5® se caracteriza por tener un requerimiento de frío invernal muy bajo, adaptándose perfectamente a las condiciones climáticas del Sureste Español y más concretamente a las condiciones de la Región de Murcia.

El árbol es vigoroso de porte semi-erguido, sin presentar caída de yemas al inicio de la brotación. La floración es abundante con una densidad de flores muy alta, y al menos 2 flores por nudo. La flor es rosácea (showy) de color rosa (Figura 1), con abundante polen y autofértil. La hoja es lanceolada, con bordes crenados, tamaño medio, y nectarios globosos en número de dos o más (Figura 2).

El fruto es un paraguayo de coloración roja (Figuras 3 y 4) exterior en un 82 % y la carne de color amarillo. El peso medio de fruto que se ha conseguido es de 75 g, con unas dimensiones de 62 mm de calibre ecuatorial y 26 mm de longitudinal (Tabla 1).

En cuanto a los caracteres que determinan la calidad, la firmeza es de 4,2 kg/cm<sup>2</sup>, la acidez es de 2,65 gr/l expresado en ácido málico y el

contenido en sólidos solubles de 11,5 ° Brix (Tabla 1).

La variedad ha tenido muy buen comportamiento en cuanto a adaptación, no ha presentado problemas de caída de yemas o irregularidades en floración, presentando además un cuajado de frutos cercano al 100%, sin los problemas típicos de caída de frutos que se dan en algunas variedades de paraguayos al final del endurecimiento de hueso, o durante el inicio de maduración (conocidas comúnmente como “purga”). En cuanto al rajado propio de los paraguayos, aunque no consigue una perfecta terminación de la zona pistilar, tampoco produce apenas problemas de rotura de hueso.

El atractivo comercial de la variedad está basado en la fecha de recolección (Tabla 1), que permite disponer de paraguayos en el mercado cuando no hay ninguna otra variedad, lo que permite obtener precios que son muy interesantes.

Los datos obtenidos en el cálculo de necesidades de frío invernal siguiendo el método descrito por Tabuenca (1964) [3] nos dio unos resultados que dejan una horquilla de 170-300 HF < 7 °C que se correspondieron con 300-450 Unidades Chill de Richardson (1974) [2] según el modelo de la Universidad de Utah, y con 22-28 porciones según el modelo de Erez y Couvillon (1987) [3], muy por debajo de los datos de las otras variedades según se puede observar en la Tabla 2.

### 3. Diferencias con otras variedades.

Las principales variedades cultivadas de paraguayo de recolección más temprana son la serie UFO: UFO-2, UFO-3 y UFO-4, obtenciones italianas (ISF) ya bien conocidas, y las variedades

Carioca y Samanta de PSB, menos conocidas ya que son de reciente implantación y de las cuales no se cuenta aún con datos propios.

Las principales diferencias de Siroco 5® con las variedades comerciales citadas son las fechas de floración y recolección. Como se puede observar en la Figura 5 la floración y recolección son unos 15 días antes que UFO-2, más de 20 respecto a UFO-3 y más de 30 antes que UFO-4. Esto lo deja en una posición muy diferenciada respecto a estas variedades a la hora de llegar pronto al mercado.

Por otro lado las diferencias de necesidades de frío invernal que se pueden observar en la Tabla 2, le permiten ampliar su cultivo a zonas mas cercanas a la costa con muy poca acumulación de frío invernal, aunque bien es cierto que el adelanto de floración limita las zonas de producción mas frías donde las heladas primaverales pueden dañar seriamente la producción.

#### 4. Conclusiones

La variedad Siroco 5® puede cubrir el inicio de la comercialización de paraguayos tanto para el mercado nacional como para la exportación, aportando el excelente sabor de los paraguayos en unas fechas en que la fruta que se comercializa es en general de alta acidez y moderado contenido en azúcar. El poder iniciar la campaña con una variedad que se diferencia en el sabor con claridad del resto de frutas de hueso en el mercado puede ser muy importante para el desarrollo del resto de la campaña. Por otro lado la posibilidad de realizar el cultivo de paraguayos a zonas más bajas, por sus pocas necesidades de frío, hará que comience antes su presencia en el mercado.

La variedad se encuentra en la fase de estudio en el Registro de Obtenciones Vegetales con NRVP: 20135103.

#### 5. Agradecimientos

A Marcos López Romero, Belén López Soto, y F. Javier Costa por su participación en los trabajos. A NOVAMED por su colaboración en el proyecto.

#### 6. Referencias bibliográficas

[1] Tabuenca, M.C., 1964. Necesidades de frío invernal de variedades de albaricoquero, melocotonero y peral. Aula Dei 7, 113–132.

[2] Richardson, E.A., Seeley, S.D., Walker, D.R., 1974. A model for estimating the completion of

rest for “Redhaven” and “Elberta” peach trees. HortScience. 1, 331–332.

[3] Erez, A., Couvillon, G.A., 1987. Characterization of the influence of moderate temperatures on rest completion in peach. J. Am. Soc. Hort. Sci. 112, 677–680.

**Tabla 1.** Datos de 2013 de la caracterización pomológica y fechas de floración y recolección de Siroco 5®, recolectado en la finca de Novamed en la Hoya del Campo (Abarán).

Año	Floración	Recolección
2011	24/feb	13/may
2012	24/feb	15/may
2013	05/feb	07/may
Laboratorio	Media	Máximo
% rojo	82	95
Peso (gr)	75	97
Calibre ecuatorial (mm)	62 (B:61-67)	66
Calibre longitudinal (mm)	26	29
Acidez (meq/l)	2,65	-
SSC (°Brix)	11,5	-
Dureza (kg/cm <sup>2</sup> )	4,2	5,8

**Tabla 2.** Necesidades de frío de diferentes variedades de paraguayos de recolección temprana.

Varietal	Horas < 7 °C	Unidades Chill	Porciones
Siroco 5®	170-300	300-450	22-28
UFO-2	400-500	700-800	31-35
UFO-3	500-600	800-850	40-43
UFO-4	500-600	800-850	42-45



Figura 1. Caracterización de flores de Siroco 5®.



Figura 2. Caracterización de hojas de Siroco 5®.



Figura 3. Frutos de Siroco 5® en finca comercial en Molina de Segura (Murcia) el 02/05/2013.



Figura 4. Diferentes imágenes de Siroco 5®.

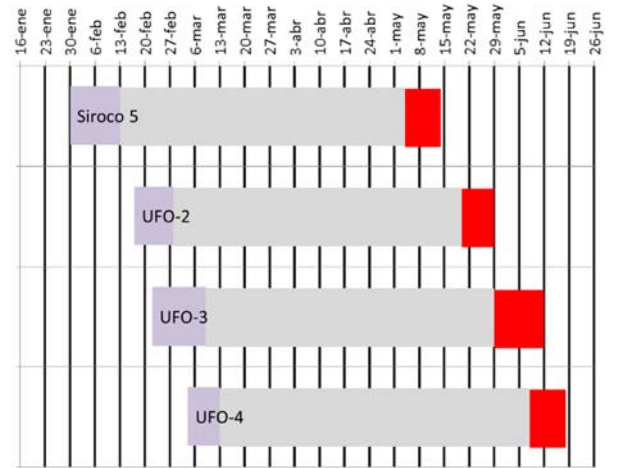


Figura 5. Calendario de floración a recolección de variedades de paraguay en 2013 en la finca de Novamed (Abarán-Murcia-España).

# Effect of the geographical origin on the presence of skeletal deformities and swimbladder anomaly in a cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L) population

## Estimation of genetic parameters

M. García-Celdrán<sup>(1)</sup>, Z. Cutáková<sup>(1)</sup>, G. Ramis<sup>(2)</sup>, E. Armero<sup>(1)</sup>

- (1) Department of Agricultural Science and Technology. Technical University of Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena, España. martanietos@hotmail.com  
(2) Departamento de Producción Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. 3100 Murcia, España

### ABSTRACT

The gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) is one of the most important Sparid farmed in Europe. However, abnormalities such as lordosis, lack of operculum and failure to inflate the swimbladder constitute a major problem for aquaculture industry by decreasing the final value of the fish. The use of stocks from different genetic origin to produce commercial fish usually cause great variability in the global quality of the end product. However, strategies that involve the development of selection schemes in sea bream for these traits of economic interest are scarce. In light of these circumstances, the effect of the geographical origin on the presence of anomalies as a measure of fish quality was analyzed. For this purpose a population of farmed gilthead sea bream obtained from broodstock from three differentiated geographical origin and reared under common conditions was analyzed from X-ray photograph for the mayor anomalies present in this species. A posteriori reconstruction of pedigree was carried out in order to determine genetic parameters for fish anomalies. An effect of the geographical origin on the presence of skeletal malformation and on the lack of functional swimbladder was found, being lordosis and lack of operculum the most common skeletal deformities. Heritabilities were medium for lack of operculum and lack of functional swimbladder and high for lordosis. A medium genetic correlation and a positive phenotypic correlation were observed between the lack of functional swimbladder and lordosis. All these findings could be relevant for the establishment of successful breeding programs in aquaculture of this species

**Keywords:** Heritabilities, genetic correlations, phenotypic correlations, lordosis and lack of operculum.

### 1. Introduction

The gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) is one of the most important Sparid farmed in Europe. The main producers of this species are Greece (39.6%), Turkey (22.5%) and Spain (11.2%). Five Spanish regions share the 100% of gilthead sea bream production; being Valencia (40.8%) and Murcia (20.5%) the most important producers [1]

Despite the growth and consolidation of the gilthead sea bream industry the high level of body abnormalities appearing in hatchery fish is an important problem for the development of this industry. This is often associated with growth depression, leading to high mortality rates [2]. Their appearance downgrades the biological performance, the marketing image, the production cost and the commercial value of the

reared fish since they are clearly evident, especially in those species such sea bream which are sold mainly as whole fish [3]. The main morphological abnormalities in fish can be grouped into five main categories depending on the aspect involved: shape, pigmentation, scales, skeleton, and swimbladder (SB) [4].

Several factors are believed to be the basis of them: Nutritional (vitamin A, C, D or tryptophan imbalances), environmental (water temperature, light, salinity, oxygen, density of eggs, heavy metal contamination), hydrodynamic conditions and genetic factor or their interaction [2,5].

Strategies that involve the development of selection schemes in gilthead sea bream for these traits of economic interest commented above are scarce especially due to the biological

characteristic of this species. Gilthead sea bream is a protandrous hermaphroditic mass-spawning species in which individuals are males during the first two years of life and then gradually become females. Mass spawning prevents knowing the genealogy of fish under culture conditions which is essential to estimate genetic parameters and to introduce selection programs. The use of molecular markers such as microsatellites are a useful tool for addressing these matters [5].

The use of different rearing systems to produce commercial fish as well as the different genetic origin of the stocks usually cause great variability of the production i.e. in the growth rates and the global quality of the end product [6]. In light of these circumstances the goals of this research were to study the effect of the geographical origin on the presence of the major anomalies present in gilt head sea bream (spine and cranial deformities and lack of functional SB) as a measure of fish quality and to estimate the genetic basis of these anomalies in order to be included in future breeding program.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Broodstocks and offspring

Samples of sea bream were captured from wild populations from three geographically differentiated origins; Cantabrian Sea (CAN), the Atlantic Ocean (ATL), and Mediterranean Sea (MED). From these samples, three broodstock were established and maintained until their spawning season. Larvae were obtained from these mass-spawning. At 84 days post-hatching a random sample of 2.500 descendents were taken to the on-growing facilities of the Centro de Cultivos Marinos de la Región de Murcia (San Pedro del Pinatar, Murcia, Spain). In this sample was proportionally represented the original geographical origins. Fish were individually tagged in the abdominal cavity with a Passive Integrated Transporter (PIT; Trovan Daimler-Benz), and distributed in 12 tanks of 850-litres in which they were reared under communal conditions. At 185 days post-hatching a random sample of about 300 juveniles from each geographical origin was slaughtered by immersion in ice cold water. In that way, near to 1.000 samples were obtained which were placed on their left side in PVC boxes (12.2 x 12.2 cm) and frozen at -20°C until anomalies determination. Fish were radiographed and the X-ray pictures were used for the skeleton and SB examination. Skeletal abnormalities in the vertebral column

were identified and classified according to a malformations catalog. The lack of left operculum was evaluated by visual inspection

### 2.2 PCR reaction Genotyping and Parental assignments

Animals were genetically characterized. For this purpose, DNA was extracted from the caudal fin (DNeasy kit QIAGEN®). DNA quality and quantity were determined using Nanodrop 2.000 spectrophotometer v.3.7 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, U.S.A.). We used the SMsa1 (Super Multiplex *Sparus aurata*) [7]. Electropherograms and genotypes were analysed using GeneMapper software (Applied Biosystem®). Parental assignments between breeder and their descendents were determined *a posteriori* using their genotypes in the exclusion method by Vitassing software.

### 2.3. Analysis data

Deformity and SB scores (0 or 1) for each individual and each type of deformity were analyzed by logistic regression, using the SPSS® software (SPSS, Chicago, IL, USA) to detect the effects of the origin of the fish. For the heritability calculation, malformation was considered as a threshold trait, and was first analysed on the observed scale (0=Normal, 1= Deformed) using VCE software with a univariate animal model:

$$Y = X\beta + Za + \varepsilon$$

where  $Y$  is the vector of observations (malformation),  $\beta$  is the vector of fixed effects (origin),  $a$  is the vector of random additive genetic effects and  $\varepsilon$  the vector of random residual effects. Then, heritability estimates were transformed to the underlying liability scale [8].

## 3. Results and Discussion

The presence of deformities is the second most economically important trait for the industrial production of sea bream [4]. The incidence of fish scored as deformed was lower in juveniles from CAN in which a 23.4% of examined fish had at least one or more kinds of deformities while

this incidence was higher (near to 40%) in fish from ATL and MED (Table 1).

Lordosis was the most common deformity, with frequencies around 20% in two of the studied origin, followed by vertebral shortening (Table 1). Several factors may cause deformities. An effect of the geographical origin was observed in the

present research as well. Individuals from CAN showed lower incidence of lordosis than those from ATL and MED. Other minor skeletal deformities such as vertebral fusion (Fig.1) and kyphosis were also detected although no effect of the geographical origin was found for them and their incidence was very low (<3%).

Lack of operculum was the cranial deformity most frequent in all origins although no statistical differences were detected (Table 1). The premaxilla was the only one cranial abnormality observed in the jaw (Fig. 1) and an effect of the geographical origin was found. Individuals from CAN showed the highest frequency followed by those from MED. Cranial skeletal deformities in the jaw were not observed in fish from ATL.

Individuals from ATL showed the highest frequency (>70%) of fish with an uninflated SB (Fig. 1) followed by those from MED and CAN.

Scarce and conflicting results have been found about genetic parameters in sea bream. Heritabilities (table 2) were found to be medium for lack of operculum and uninflated SB and high for lordosis in agreement with [2]. Genetic correlations among skeletal malformation in the column were high. The genetic correlations between malformation in the column and in the jaw were found to be very imprecise. The highest and positive phenotypic correlation was found between lordosis and lack of functional SB.

#### 4. Conclusions

We observed an effect of the geographical origin on the presence of fish deformities which constitutes relevant information for the establishment of the broodstock to produce commercial fish. High heritability for lordosis and medium for lack of operculum and functional SB, which are the most common abnormalities in this species, were observed. Moreover, a medium genetic correlation and positive phenotypic correlation was found between the lack of functional swimbladder and lordosis. All this findings could be relevant for the establishment of successful breeding programs in aquaculture of this species

#### 5. Acknowledgments

This study was supported by the PROGENSA® project Spanish Ministry of Environment, Rural and Marine, JACUMAR.

#### 6. References

- [1] APROMAR, 2012. Fish marine aquaculture in Spain (<http://www.apromar.es>)
- [2] Andrades, J.A., Becerra, J., Fernández-Llébrez, P., 1996. Skeletal deformities in larval, juvenile and adult stages of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquacult* 141, 1–11
- [3] Koumoundouros, G., Oran, G., Divanach, P., Stefanakis, S. & Kentouri, M., 1997. The opercular complex deformity in intensive gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larviculture. Moment of apparition and description. *Aquacult* 156, 165–177.
- Divanach, P., Boglione, C., Menu, B., Koumoundouros, G., Kentouri, M., Cataudella, S., 1996. Abnormalities in finfish mariculture: an overview of the problem, causes and solutions. In: International Workshop, Verona, Italy, October 16– 18, 1996. *Eur. Aquacult. Soc., Oostende, Belgium*, pp. 45– 66.
- [5] Castro, J., Pino-Querido, A., Hermida, M., Chavarrias, D., Romero, R., Garcia-Cortes, L.A., Toro, M.A., Martinez, P., 2008. Heritability of skeleton abnormalities (lordosis, lack of operculum) in gilthead seabream (*Sparus aurata*) supported by microsatellite family data. *Aquacult* 279, 18–22.
- [6] Ayala, M.D., Abdel, I., Santaella, M., Martínez, C., Periago, M.J., Gil, F., 2010. Muscle tissue structural changes and texture development in sea bream, *Sparus aurata* L., during postmortem storage. *LWT-Food Sci. Technol.* 43, 465-475
- [7] Lee-Montero, I., Navarro, A., Borrell, Y., García-Celdrán, M., Armero, E., Berbel, C., Zamorano, M.J., Sánchez, J.J., Estévez, A., Ramis, G., Manchado, M., Afonso, 2013. Development of the first standardised panel of two new microsatellite multiplex PCRs for gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Anim. Genet.* 44, 533-546
- [8] Dempster, E.R., Lerner, I.M., 1950. Heritability of threshold characters. *Genetics* 35, 212–236

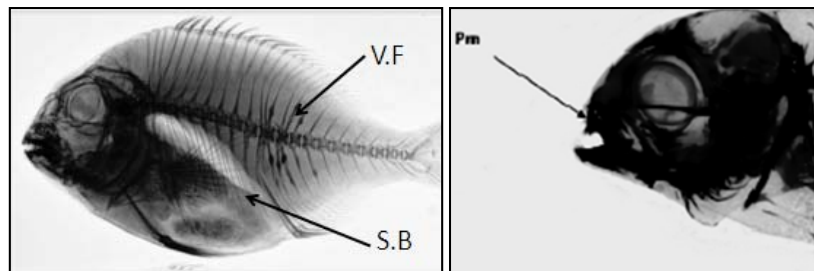


**Table 1:** Frequencies (%) of: deformed individuals, skeletal deformities in the vertebral column, cranial skeletal deformities and lack of an inflated swimbladder in gilthead sea bream from three differentiated geographical origins

Geographical origin <sup>1</sup>	CAN	ATL	MED
N	304	282	323
Deformed	23.4 <sup>a</sup>	37.9 <sup>b</sup>	38.7 <sup>b</sup>
Lordosis	6.6 <sup>a</sup>	21.6 <sup>b</sup>	19.2 <sup>b</sup>
Vertebral shortening	3.6 <sup>a</sup>	7.8 <sup>b</sup>	10.5 <sup>b</sup>
Vertebral Fusion	1.3 <sup>a</sup>	1.4 <sup>a</sup>	1.5 <sup>a</sup>
Kyphosis	0.7 <sup>a</sup>	0.7 <sup>a</sup>	2.5 <sup>a</sup>
Lack of operculum	8.2 <sup>a</sup>	9.2 <sup>a</sup>	5.9 <sup>a</sup>
Premaxillar	3.9 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	1.8 <sup>c</sup>
Uninflated SB	6.9 <sup>a</sup>	70.9 <sup>b</sup>	32.5 <sup>c</sup>

<sup>1</sup>Geographical origin: CAN=Cantabrian Sea, ATL=The Atlantic Ocean, MED= Mediterranean Sea

<sup>ab</sup>Different superscripts within each row indicate significant differences among geographical origins (P <0.05).



**Figure 1:** Column of sea bream showing V.F =vertebral fusion; S.B = Uninflated swimbladder. Head of gilthead sea bream showing Pm = premaxillar deformity.

**Table 2:** Heritabilities ± standard errors (in bold on the diagonal), genetic (above diagonal) and phenotypic correlations (below diagonal) among skeletal deformities and uninflated SB in gilthead sea bream from three differentiated geographical origins

	Lordosis	V.Shortening	V.Fusion	Kyphosis	Operculum	Premaxillar	SB
Lordosis	<b>0.58±0.18</b>	-0.99±0.01	-0.99±0.01	0.99±0.01	-0.03±0.17	0.12±0.53	0.45±0.23
V.Shortening	-0.15	<b>0.03±0.06</b>	0.99±0.01	-0.98±0.01	0.99±0.01	-0.98±0.49	-0.69±0.20
V.Fusion	0.04	-0.03	<b>0.05±0.10</b>	0.98±0.01	-0.99±0.01	0.99±0.98	-0.99±0.01
Kyphosis	-0.06	-0.04	0.14	<b>0.07±0.14</b>	-0.99±0.01	0.59±0.97	-0.96±0.16
Operculum	-0.03	-0.02	0.02	-0.03	<b>0.19±0.13</b>	-0.09±0.03	-0.45±0.43
Premaxillar	-0.01	-0.03	-0.01	-0.02	-0.04	<b>0.12±0.22</b>	0.35±0.93
SB	0.31	0.07	0.04	0.06	0.10	-0.06	<b>0.24±0.11</b>

## Selección de nuevas variedades de vid resistentes a enfermedades fúngicas, generadas mediante cruzamientos con Monastrell

B. García, A. Fuentes, J.A. Martínez, C. Egea, A. Martínez-Cutillas, L. Ruiz-

García

Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA). Departamento Viticultura. Equipo: Viticultura y Enología C/ Mayor s/n, 30150-La Alberca (Murcia), España. [beatriz.garcia@carm.es](mailto:beatriz.garcia@carm.es)

### RESUMEN

La viticultura y la vinicultura han sido tradicionales desde la antigüedad en Murcia (España), siendo la vid un cultivo de gran importancia económica en esta zona. Sin embargo, las enfermedades causadas por hongos afectan gravemente al rendimiento, el coste y la calidad de la producción de la vid. Estas enfermedades se controlan en la actualidad mediante tratamientos con fungicidas, repetidos durante cada temporada de cultivo. La obtención de nuevas variedades resistentes de alta calidad reduce tanto el coste de producción de la vid como el riesgo ambiental. Basándonos únicamente en los datos de evaluación fenotípica, es poco factible conseguir la acumulación de genes de resistencia en una nueva línea mejorada. El uso de marcadores moleculares proporciona una nueva herramienta para los mejoradores y puede ayudar a superar este problema. En este trabajo, se presentan las actividades de investigación en el IMIDA orientadas a establecer una selección asistida por marcadores (MAS) para la resistencia a las enfermedades por hongos en la vid, mediante cruzamientos de 'Monastrell', una variedad de vinificación muy bien adaptada a las condiciones secas del clima mediterráneo, con plantas resistentes a enfermedades fúngicas.

**Palabras clave:** mildiu; oidio; mejora; marcadores; progenies segregantes.

### 1. Introducción y Objetivos

La mayoría de las variedades de vid (*Vitis vinifera*) en Europa son susceptibles a hongos patógenos. El oidio y el mildiu, causados por los hongos patógenos *Uncinula necator* (sin. *Erysiphe necator*) y *Plasmopora viticola*, respectivamente, son un riesgo importante para la viticultura y pueden reducir sustancialmente el rendimiento y la calidad. Las enfermedades fúngicas son controladas mediante la utilización de fungicidas aplicados periódicamente durante el período vegetativo. Muchos de los productos químicos se emplean constantemente para evitar las pérdidas en los cultivos y para garantizar la cosecha de uvas sanas. Podría lograrse una reducción del nivel de fungicidas aplicados mediante el desarrollo de variedades de vid que combinan una mayor resistencia a patógenos fúngicos junto con una fruta de alta calidad. Diversas fuentes de resistencia a las enfermedades fúngicas se han identificado en variedades de *Vitis* americana, en especies de *Vitis* asiática y también en *Muscadinia rotundifolia*. En los programas de mejora, se puede introducir una resistencia en *Vitis vinifera*

mediante cruzamientos inter-específicos con estas especies. Sin embargo, y debido a la baja calidad de la uva, es necesario incluir cruces adicionales con variedades de *Vitis vinifera* para lograr altas calidades. Por lo tanto, el desarrollo de una nueva variedad de vid resistente a una enfermedad fúngica es un proceso a largo plazo y costoso.

Por el momento, distintos programas de mejora han dado como resultado una gama de variedades nuevas con características de alta calidad y resistencia a hongos. Las investigaciones recientes han llevado a la identificación genética de diferentes loci de resistencia. También han sido identificados diferentes marcadores asociados a estos loci de resistencia ([www.vitisgen.org/marker.html](http://www.vitisgen.org/marker.html); [www.vivc.de](http://www.vivc.de)). El empleo de marcadores moleculares asociados a loci que confieren resistencia permite rastrear la introgresión de los loci correspondientes en las plantas en una etapa temprana de desarrollo, lo que resulta en una aceleración del proceso de mejora [1]. Desde el punto de vista de la mejora, es altamente deseable combinar

en una misma línea mejorada tantos genes de resistencia como sea posible debido a que la presencia de un único locus de resistencia puede no ser suficiente para una resistencia robusta. En este sentido, la selección asistida por marcadores (MAS) permite la selección de genotipos con una resistencia combinada y distinguir, además, las diferentes fuentes de resistencia utilizadas [2].

La viticultura y la elaboración del vino han sido actividades tradicionales en Murcia. Desde finales del siglo pasado, se está llevando a cabo un programa de mejora de la uva de vinificación en el IMIDA (Murcia). El objetivo principal de este programa es la obtención de nuevos cultivares, con la mejor combinación genética posible para mantener la competitividad internacional.

'Monastrell' es un cultivar local de vino español muy bien adaptado a las condiciones secas del clima mediterráneo. Por esta razón, se han desarrollado cuatro progenies F1: 'Monastrell' x 'Cabernet Sauvignon', 'Monastrell' x 'Syrah', 'Monastrell' x 'Tempranillo' y 'Monastrell' x 'Barberá'. Estas progenies son muy interesantes para la identificación de QTL (Quantitative Trait Loci) responsables de caracteres de calidad.

Recientemente, hemos iniciado un proyecto cuyo objetivo es la selección de híbridos de vid resistentes a las enfermedades por hongos, generados por cruces que involucran a 'Monastrell'. Las nuevas variedades de vid resistentes, permitirán elaborar vinos de calidad, reducir el impacto ambiental de los fungicidas y garantizar una seguridad alimentaria de alto nivel. Nuestro objetivo es utilizar marcadores moleculares asociados al rasgo de resistencia a hongos para ayudar en los programas de mejora tradicionales, seleccionando con ello vides mejoradas portadoras de alelos de resistencia a mildiu y oidio.

## 2. Materiales y Métodos

Inicialmente, las investigaciones se llevarán a cabo en tres progenies F1: "Monastrell" x "Regent", "Monastrell" x "Kishmish vatkana" y "Monastrell" x "*Vitis romanetii*". "Regent" es un híbrido con resistencia cuantitativa contra mildiu y oidio [3, 4], obtenido en Alemania en 1996 para uso comercial. "Kishmish vatkana" (*Vitis vinifera*), variedad de vid cultivada en Asia Central, y *Vitis romanetii* son resistentes al oidio [5, 6]. Tras la germinación de las semillas (figura 1), las plántulas se plantarán en campo (figura 2)

con sus propias raíces y serán evaluadas para la resistencia a mildiu y oidio en condiciones de infección natural. El área experimental no será tratada con fungicidas para aumentar la presión y la tasa de infección de oidio. La clasificación de la susceptibilidad a los hongos en los híbridos evaluados se realizará mediante la observación visual y se anotarán desde 0 (ausencia de la infección en las hojas) a 5 (una infección muy fuerte), según la clasificación de la *Organisation Internationale de la Vigne et du Vin* (OIV). Los marcadores asociados con la resistencia a patógenos fúngicos se utilizarán para la selección de los híbridos mejorados (Tabla 1). Los híbridos resistentes seleccionados se replicarán y serán evaluados de nuevo en condiciones controladas, para su resistencia a mildiu y oidio.

Actualmente, mantenemos 185 plantas F1 que proceden del cruce de "Monastrell" x "Regent" (figura 3), cultivadas sobre sus propias raíces en un campo experimental situado en la finca Hacienda Nueva (Cehegín, Murcia). Estos híbridos se evaluarán para ver la resistencia a hongos este año, y la presencia o ausencia de los alelos de resistencia relacionada - transferidas desde "Regent" (REN3 +, Rpv3 +, Rpv4 +, Rpv11 +). La progenie de "Monastrell" x "Kishmish vatkana" y "Monastrell" x *Vitis romanetii* se desarrollarán en 2014.

La finalidad del programa es seleccionar híbridos con la presencia de alelos de resistencia transferidos desde "Regent", "Kishmish vatkana" y "*V. romanetii*". Éstos híbridos serán utilizados como padres en nuevos cruces y utilizaremos una MAS para hacer un seguimiento de la acumulación de genes de resistencia en una nueva variedad mejorada. El resultado esperado de este proyecto es el desarrollo de variedades de vid que combinen una mayor resistencia a patógenos fúngicos y que presenten alta calidad de la baya y produzcan un buen vino.

## 3. Resultados y Discusión

Actualmente estamos comenzando con las extracciones de ADN para evaluar la presencia o ausencia de los diferentes alelos ligados a resistencia en "Regent", y se iniciará la caracterización fenotípica en campo para síntomas de las enfermedades. Este año vamos a comenzar también a realizar los cruzamientos de Monastrell con los otros parentales.

#### 4. Agradecimientos

Los autores desean agradecer el apoyo financiero del Fondo Europeo de Desarrollo Regional y de la Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia. Este trabajo está financiado por el proyecto PO07-37 cofinanciado al 80% por fondos FEDER.

#### 5. Referencias bibliográficas

- [1] Töpfer, R., Hausmann, L., Eibach, R. 2011. Molecular breeding. In: Adam-Blondon AF, Martínez-Zapater JM, Kole C (eds) Genetics, genomics and breeding of grapes. Science Publishers, Enfield, pp 160–185.
- [2] Eibach, R., Zyprian, E., Welter, L., Töpfer, R. 2007. The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. *Vitis* 46: 120–124.
- [3] Welter, L.J., Gokturk-Baydar, N., Akkurt, M. et al. 2007. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L). *Mol Breeding* 20: 359–374
- [4] Fischer, B.M., Salakhutdinov, I., Akkurt, M. et al. 2004. Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. *Theor Appl Genet* 108: 501–515.
- [5] Hoffmann, S., Di Gaspero, G., Kovács, L., Howard, S., Kiss, E., Galbács, Zs., Testolin, R., Kozma P. 2008. Resistance to *Erysiphe necator* in the grapevine ‘Kishmish vatkana’ is controlled by a single locus through restriction of hyphal growth. *Theor. Appl. Genet.* 116: 427-438.
- [6] Riaz, S., Tenschler, A.C., Ramming, D.W., Walker, M.A. 2011. Using a limited mapping strategy to identify major QTLs for resistance to grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*) and their use in marker-assisted breeding. *Theor Appl Genet* 13: 1059–1073.

#### Tablas y Figuras

Tabla 1. Marcadores utilizados para la selección de variedades de vid resistentes a enfermedades fúngicas.

Locus	Resistance to	Source	References
<i>Ren1</i>	Powdery mildew	‘Kishmish vatkana’	5
<i>Ren3</i>	Powdery mildew	‘Regent’	3
<i>Ren4</i>	Powdery mildew	<i>V. romanetii</i>	6
<i>Rpv3</i>	Downy mildew	‘Regent’	3
<i>Rpv4</i>	Downy mildew	‘Regent’	3
<i>Rpv11</i>	Downy mildew	‘Regent’	4

“Kishmish vatkana” y “*V. romanetii*” proceden del IMIDRA (El Encía, Alcalá de Henares, Madrid).

“Regent” procede del *JKI Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof* (Siebeldingen, Alemania).



Figura 1. Germinación semillas



Figura 2. Trasplante en campo

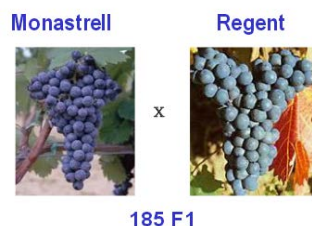


Figura 3. Racimos de Monastrell y Regent

## Comportamiento de patrones de cerezo en las condiciones edafoclimáticas de la Región de Murcia

G. López-Ortega<sup>(1)</sup>, F. García<sup>(2)</sup>, C. Frutos<sup>(1)</sup>, A. Bayo-Canha<sup>(1)</sup>, D. López<sup>(1)</sup>, D. López-Romero<sup>(2)</sup>, D. Frutos<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA). C/Mayor s/n, 30150. La Alberca, Murcia. gregorio.lopez2@carm.es

<sup>(2)</sup> Dirección Gral. de Industrias Agrarias y Capacitación Agraria.

### RESUMEN

En este trabajo se expone la influencia que ejercen los patrones Adara, Mariana 2624, Mayor, MaxMa 14, Santa Lucia GF 64, Gisela 5, Gisela 6, Piku 1, Piku 3 y Piku4 en el crecimiento vegetativo, producción y calidad del fruto de la variedad de cerezo NewStar. Este ensayo se ha realizado en un suelo pesado, calcáreo y con alto contenido en arcilla ubicado en el término municipal de Jumilla. Se han encontrado diferencias significativas para parámetros como el vigor, producción, tamaño del fruto, contenido en sólidos solubles y firmeza. Las mayores producciones acumuladas fueron para patrones vigorosos como son Mariana 2624, Mayor y Adara. Los patrones de menor vigor como Gisela 5 y Piku 1, presentaron una tendencia excesiva al enanismo. Aquellos patrones peor adaptados a las condiciones edafoclimáticas del ensayo como Gisela 5, Gisela 6, SL 64, Mayor y Piku 1 presentaron mayor porcentaje de mortandad.

**Palabras clave:** *Prunus avium* L, portainjertos, adaptación.

### 1. Introducción

Diferentes estudios con *Prunus* sp. han demostrado que el patrón ejerce una influencia sobre la variedad injertada sobre ellos. La mayor parte de los trabajos realizados en cerezo, ponen de manifiesto que los efectos más comunes que el patrón ejerce sobre la variedad injertada están ligados a parámetros como la firmeza, tamaño, ácidos orgánicos y contenido en azúcares, aunque también se han encontrados diferencias para la eficiencia del uso del agua, tamaño de la planta, periodo de floración, fecha de recolección, supervivencia y eficiencia productiva [1].

Actualmente existen numerosos patrones para cerezo. Esto parece estar relacionado con la gran diversidad de suelos y climas en los cuales se cultiva. El uso de patrones bien adaptados a los suelos específicos de las diferentes áreas, permite que se exprese adecuadamente el potencial de las variedades cultivadas [1,3,4]. A lo largo de los últimos 50 años ha habido una tendencia al uso de patrones que reducen el vigor de las variedades. Tal uso ha permitido aumentar la densidad de plantación, reducir los trabajos de poda y acercar la fruta al suelo, reduciéndose así los gastos de recolección y aumentando los beneficios del cultivo [3,5].

El objetivo de este estudio ha consistido en la evaluación de diez patrones de cerezo injertados con la variedad 'New Star' para determinar aquellos patrones mejor adaptados a las condiciones edafoclimáticas de la Región de Murcia.

### 2. Materiales y Métodos

En Mayo de 2007 se establecieron dos ensayos de patrones de cerezo en la finca "La Maestra" en el término municipal de Jumilla. Durante los años 2010, 2011 y 2012 se han tomado datos de los siguientes parámetros: Sección de tronco (cm<sup>2</sup>), producción (Kg/árbol), calibre (mm), peso del fruto (g), firmeza (g/mm), contenido en sólidos solubles (°Brix) y acidez (meq/l ácido málico). Todos los portainjertos se injertaron en el invierno de 2006 con la variedad autofértil 'New Star' y posteriormente se formaron en vaso de brazos múltiples. Se dispusieron con un marco de plantación de 5x2 m, 2 emisores de 4 l/h por árbol y se fertirrigaron según las necesidades específicas del cultivo.

#### 2.1 Ensayo de patrones de vigor medio a alto.

En este ensayo se han evaluado los patrones 'Mayor' (Selección IMIDA de híbrido de melocotonero x almendro), 'Mariana 2624' (P. cerasifera x P. Munsionana), 'Adara' (P. cerasifera), INRA 'SL64' (P. mahaleb) y 'Maxma 14' (P. mahaleb x P. avium). Se realizó una

distribución de bloques al azar con 16 repeticiones, estando la parcela elemental constituida por 5 portainjertos con una planta por patrón. Debido a la incompatibilidad de las combinaciones entre los cultivares de cerezo y los patrones ‘Mayor’ y ‘Mariana 2624’, se usó como intermediario ‘Adara’ (*P. cerasifera*) para compatibilizar el cerezo con los anteriores patrones.

### 2.2 Ensayo de patrones de vigor medio a bajo.

En este ensayo se han evaluado los patrones ‘Gisela 5’ y ‘Gisela 6’ (*P. cerasus* x *P. canescens*), y ‘Piku 1’ (*P. avium* x (*P. canescens* x *P. tormentosa*)), ‘Piku 3’ (*P. pseudocerasus* x (*P. canescens* x *P. incisa*)), ‘Piku 4’ (*P. cerasus* x *P. kursai*), ‘SL64’ y ‘Maxma 14’. Se realizó una distribución de bloques al azar, estando constituida cada una de las 8 parcelas elementales de las que constó el ensayo de 7 portainjertos con un árbol por patrón.

## 3. Resultados y Discusión

### 3.1 Ensayo de patrones de vigor medio a alto.

La mayor mortandad registrada durante los años estudiados fueron para los patrones ‘SL64’ (63%) y ‘Mayor’ (44%), seguidos de ‘Maxma 14’ (25%), ‘Adara’ (13%) y ‘Mariana 2624’ (6%). Este resultado parece ser acorde con las características del suelo, pesado con alto contenido en arcilla, en donde se ubica el ensayo. Así, tanto ‘SL 64’ como ‘Mayor’, prefieren suelos profundos, sin problemas de asfixia radicular.

En la Tabla 1 se muestra la producción media, producción acumulada y diámetros de tronco de los portainjertos estudiados. Las mayores producciones medias y acumuladas en el periodo estudiado se registraron para los portainjertos ‘Mariana 2624’ y ‘Mayor’. Este último alcanzó una producción máxima de más de 40 Kg/planta en 2011. ‘Adara’, usado como patrón, (Tabla 2), destacó por tamaño de fruto (8,35 g), mayor concentración de sólidos solubles (18,18 °Brix) y mayor firmeza (13,44 g/mm), resultados que coinciden con los encontrados por otros autores [1] para la variedad ‘Star Hardy Giant’.

### 3.2 Ensayo de patrones de vigor medio a bajo.

La mayor mortandad registrada durante los años estudiados fue para los patrones ‘Gisela 6’ y ‘Piku 1’ (75%), de los cuales no se muestran resultados debido al reducido número de plantas que quedaron. Se contabilizó un 38 % de marras en ‘Gisela 5’, y un 13 % en ‘SL64’ y ‘Piku 3’. ‘Piku 4’ y ‘Maxma 14’ no registraron bajas.

En la Tabla 3 se muestra la producción media, producción acumulada y diámetros de tronco de los citados portainjertos. Las mayores producciones medias y acumuladas en el periodo estudiado se registraron sobre ‘Piku 4’ y ‘SL64’, alcanzándose producciones máximas de 25,1 Kg/árbol y 24,8 Kg/árbol en 2010, respectivamente. ‘Piku 3’ destacó por los resultados obtenidos en calidad del fruto (Tabla 4). Dicho portainjerto mostró el mayor tamaño de fruto (9,25 g), la mayor concentración de sólidos solubles (19,65 °Brix), la mayor acidez (9,05 meq/l) y la mayor firmeza (13,96 g/mm) en el periodo estudiado.

## 4. Conclusiones

Los resultados de este trabajo muestran que en las condiciones edafoclimáticas de la Región de Murcia, árboles injertados en patrones de bajo vigor como ‘Gisela 5’ y ‘Piku 1’ tienen una tendencia excesiva al enanismo. Por el contrario, un mejor comportamiento agronómico tuvieron aquellos patrones más vigorosos con mayores cosechas y frutos de mejor calidad que los menos vigorosos. La buena adaptación a las condiciones de cultivo de árboles injertados en ‘Mariana 2624’ y ‘Adara’ hizo que se obtuvieran buenas cosechas y con frutos de muy buena calidad, además se adaptaron mejor a las condiciones de asfixia radicular que otros injertados sobre ‘Gisela 5’, ‘Gisela 6’, ‘SL 64’, ‘Mayor’ y ‘Piku1’ que presentaron una mayor mortandad.

## 5. Agradecimientos

A los componentes del Grupo Cerezo I+D. Este trabajo forma parte del proyecto INIA RTA:2006-00057-00-00 y ha sido cofinanciado por el proyecto PO07-027. Este trabajo ha sido realizado en el marco de la Acción Cost FA 1104.

## 6. Referencias bibliográficas

- [1] Cantin, C.M.; Pinochet, J.; Gogorcena, Y.; Moreno, M.A. (2010). Growth, yield and fruit quality of ‘Van’ and ‘Stark Hardy Giant’ sweet cherry cultivars as influenced by grafting on different rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 123:329-335.
- [2] Lang, G. A. (2000). Precocious, dwarfing, and productive – How will new cherry rootstocks impact the sweet cherry industry?. *HortTechnology*, 10 (4), 719-725.
- [3] Long, L. E.; Kaiser, C. (2010). PNW 619: Sweet cherry rootstock. Corvallis, OR: Oregon State University, 8 pp.
- [4] Sansavini, S.; Lugli, S. (2008). Sweet cherry breeding programs in Europe and Asia. *Acta Hort.* (ISHS) 795:41-58.

[5] Whiting, D. M.; Lang, G. A.; Ophardt, D. (2005). Rootstock and training system affect sweet cherry growth, yield, and fruit quality. HortScience, 40(3): 582-586.

### Tablas y Figuras

**Tabla 1:** Producción media y acumulada de los portainjertos de vigor medio a alto estudiados durante los años 2010, 2011 y 2012. Sección de tronco alcanzado en invierno de 2012, medido a 25 cm del suelo. Evaluación realizada a partir de 5 plantas/portainjerto. En cada columna, letras diferentes indican diferencias significativas con  $P \leq 0,05$ , test de Duncan.

Patrones	Producción media (Kg/árbol)	Producción acumulada (Kg/árbol)	Sección tronco (cm <sup>2</sup> )
Mariana	21,1 a	63,4 a	144,0 a
Mayor	19,8 a	59,3 a	121,0 b
Adara	13,5 b	40,5 b	123,7 ab
SL 64	7,7 c	23,1 c	91,6 c
Maxma 14	7,4 c	22,3 c	93,9 c

**Tabla 2:** Peso del fruto en gramos<sup>(1)</sup>, cantidad de sólidos solubles<sup>(2)</sup>, acidez<sup>(2)</sup> y Firmeza<sup>(3)</sup>. Los resultados obtenidos son valores medios obtenidos durante los años 2010, 2011 y 2012. Evaluación realizada a partir de 5 plantas/portainjerto. En cada columna, letras diferentes indican diferencias significativas con  $P \leq 0,05$ , test de Duncan.

Patrones	Peso fruto (g)	SS (°Brix)	Acidez (meq/l) <sup>(4)</sup>	Firmeza (g/mm) <sup>(5)</sup>
Adara	8,3 a	18,1 a	7,81 a	13,4 a
Mariana	7,9 b	17,7 ab	7,8 a	13,0 ab
Mayor	7,6 c	17,1 c	7,4 a	12,5 bc
SL 64	7,0 d	17,8 ab	8,0 a	12,0 c
Maxma 14	6,6 e	17,5 bc	7,4 a	13,1 ab

<sup>(1)</sup> Calculado a partir de 15 frutos/patrón

<sup>(2)</sup> Calculados a partir del zumo de 10 frutos/patrón

<sup>(3)</sup> Calculado de la media de 10 frutos/patrón

<sup>(4)</sup> ml de disolución 0.1 N de NaOH requerida para ajustar el pH de 10 ml de zumo a un valor de 8.1.

<sup>(5)</sup> Fuerza requerida para comprimir el fruto 1 mm.

**Tabla 3:** Producción media y acumulada de los portainjertos de vigor medio a bajo estudiados durante los años 2010, 2011 y 2012. Sección de tronco alcanzado en invierno de 2012, medido a 25 cm del suelo. Evaluación realizada a partir de 5 plantas/portainjerto. En cada columna, letras diferentes indican diferencias significativas con  $P \leq 0,05$ , test de Duncan.

Patrones	Producción media (Kg/árbol)	Producción acumulada (Kg/árbol)	Sección tronco (cm <sup>2</sup> )
Piku 4	11,2 a	33,5 a	88,3 b
SL 64	10,7 a	31,9 a	100,6 a
Maxma 14	8,1 ab	24,4 ab	91,8 b
Piku 3	6,0 b	18,1 bc	107,9 a
Gisela 5	3,0 c	8,6 c	25,2 c

**Tabla 4:** Peso del fruto en gramos<sup>(1)</sup>, cantidad de sólidos solubles<sup>(2)</sup>, acidez<sup>(2)</sup> y Firmeza<sup>(3)</sup>. Los resultados obtenidos son valores medios obtenidos durante los años 2010, 2011 y 2012. Evaluación realizada a partir de 5 plantas/portainjerto. En cada columna, letras diferentes indican diferencias significativas con  $P \leq 0,05$ , test de Duncan.

Patrones	Peso fruto (g)	SS (°Brix)	Acidez (meq/l) <sup>(4)</sup>	Firmeza (g/mm) <sup>(5)</sup>
Piku 3	9,2 a	19,6 a	9,0 a	13,9 a
Piku 4	8,3 b	18,3 c	8,0 b	12,9 ab
SL 64	8,2 b	18,6 bc	8,1 b	13,8 a
Maxma 14	7,4 c	18,6 c	7,6 b	13,3 ab
Gisela 5	7,3 c	19,1 ab	7,5 b	12,3 b

Calculado a partir de 15 frutos/patrón

<sup>(2)</sup> Calculados a partir del zumo de 10 frutos/patrón

<sup>(3)</sup> Calculado de la media de 10 frutos/patrón

<sup>(4)</sup> ml de disolución 0.1 N de NaOH requerida para ajustar el pH de 10 ml de zumo a un valor de 8.1.

<sup>(5)</sup> Fuerza requerida para comprimir el fruto 1 mm.

## Efecto de la distancia de la planta al foco emisor de luz durante la fase de multiplicación del cultivo *in vitro* de *Limonium sinuatum*

J. Sánchez<sup>(1,2)</sup>, A. Calderón<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria. Área de Fisiología Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena. España. [jesus.tecnologia@hotmail.com](mailto:jesus.tecnologia@hotmail.com)

<sup>(2)</sup> Barberet & Blanc, S.A. Puerto Lumbreras, Murcia. España.

### RESUMEN

La luz juega un papel fundamental en el desarrollo de las plantas. Aparte de su efecto sobre la acumulación de biomasa a través de la fotosíntesis, la intensidad y la calidad de la luz determinan la forma y el tamaño de la planta. En este trabajo se muestran los resultados del ensayo llevado a cabo para estudiar el comportamiento de dos variedades de color azul de *Limonium sinuatum*, “Aqua Blue” (AQ) y “Duel Violet” (DV), con respecto a la distancia de la fuente emisora de luz durante la fase de multiplicación de su cultivo *in vitro*. Se llevaron a cabo cuatro tratamientos con diferentes intensidades luminosas, utilizando un medio Murashige and Skoog (MS) suplementado con N<sup>6</sup>-benziladamina (BA), y para cada uno de ellos se midió la radiación fotosintéticamente activa (PAR), cuantificando el flujo de fotones fotosintéticamente activos (FFF). Posteriormente, se tomaron medidas del crecimiento de las plantas, de la tasa de propagación y de la concentración de pigmentos fotosintéticos (clorofila a, clorofila b y carotenoides). La disminución de la distancia al foco emisor de luz no tuvo ningún efecto negativo sobre las plantas. Así que, la reducción de la distancia entre bandejas dentro de una cámara de cultivo *in vitro*, llevaría a un mejor aprovechamiento del espacio disponible sin perjudicar la calidad de las plantas.

**Palabras clave:** Intensidad luminosa; limonio; micropropagación; pigmentos fotosintéticos.

### 1. Introducción

*Limonium sinuatum* es una especie de la familia de las Plumbagináceas muy apreciada porque tiene un buen mercado tanto para flor seca como para flor en fresco.

Unos de los problemas que presenta esta especie es la obtención masiva de plantas. La propagación convencional de muchos cultivares de *Limonium* se hace por semilla o por esquejes, de manera que la obtención de la planta lleva unos 6 u 8 meses, con un rendimiento limitado (20-30 %) y en muchos casos las plantas obtenidas no son homogéneas. Como alternativa se suele utilizar la propagación *in vitro* o micropropagación, que se realiza en laboratorio bajo condiciones controladas. A pesar de las indudables ventajas que ofrece este método, es necesario solventar una serie de problemas que pueden aparecer y que limitarían el rendimiento del proceso. Además, la explotación comercial de estas técnicas requiere la optimización de una serie de parámetros que, en la mayor parte de los

casos, debe hacerse cultivar por cultivar. Entre los factores que se deben tener en cuenta tenemos el método de establecimiento [1,2], la elección del método de multiplicación, el ajuste de los medios de cultivo (nutrientes y hormonas) [3], la 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 que comprende el proceso con el fin de conseguir suficientes plantas con la calidad apropiada para obtener la máxima rentabilidad.

En este trabajo se realizó un ensayo de dos variedades de color azul de limonio, “Aqua Blue” y “Duel Violet”, durante la fase de multiplicación *in vitro*, con el objetivo de saber qué efecto tiene la distancia de la fuente emisora de luz a la planta sobre su desarrollo. Esto es importante, ya que



unos de los problemas de los productores de plantas micropropagadas es la limitación de espacio dentro de las cámaras de cultivo, y por este motivo se busca reducir el espacio entre baldas en las estanterías utilizadas.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

Para realizar este ensayo se han utilizado plantas establecidas en cultivo *in vitro* de *Limonium sinuatum* de las variedades “Aqua Blue” y “Duel Violet” que se encuentran 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 suplementada con un 4 % (p/v) de sacarosa, y N<sup>6</sup>-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 23°C, con un fotoperiodo de 16 h, y diferentes tratamientos de iluminación.

### 2.2 Tratamientos

Para estudiar el efecto de la distancia de la fuente emisora de la luz se establecieron cuatro tratamientos (Fig. 1). En el T-1 las plantas estaban situadas a 18 cm de distancia, en el T-2 (control, por ser la distancia habitualmente utilizada), T-3 y T-4 estaban a 12,5 cm, 8 cm y 2 cm, respectivamente. Se hizo una correlación entre la distancia al foco emisor y el flujo de fotones fotosintéticos (FFF) (Tabla 1), utilizando un luxómetro ECO LX1010B. A continuación, se usó un coeficiente obtenido de unas tablas de la empresa OSRAM para sus tubos fluorescentes que permite realizar la conversión entre luxes y flujo de fotones fotosintéticos.

### 2.3 Diseño y análisis estadístico

En este ensayo se cultivaron 25 plantas por variedad, tratamiento y subcultivo. Se realizaron cuatro subcultivos, es decir, cuatro repeticiones. Cada subcultivo tenía una duración de 35 días. Al final de cada periodo se tomaron medidas del crecimiento y de la tasa de propagación de los cultivos. Posteriormente, las muestras fueron congeladas y homogeneizadas en presencia de nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C hasta su utilización. La determinación de la concentración

de pigmentos fotosintéticos en el material procedente de cada tratamiento se llevó a cabo en extractos metanólicos usando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603. Las concentraciones se expresan en microgramos de pigmento por gramo de peso fresco, para lo cual se utilizaron las ecuaciones correspondientes descritas en [5]. Los datos recogidos sobre crecimiento, tasa de multiplicación y pigmentos fotosintéticos se trataron estadísticamente.

## 3. Resultados y Discusión

### 3.1 Crecimiento y tasa de multiplicación

El crecimiento en las dos variedades al cabo de los 35 días se vio ligeramente afectado por la cercanía al foco emisor de luz, mejorando muy poco en el T-4 con respecto al T-1 (Fig. 1 y Fig. 2). Sin embargo, la tasa de multiplicación sí fue menor para el tratamiento T-4 en Duel Violet (Fig. 3), con respecto al T-4 en Aqua Blue (Fig. 4). Para las dos variedades el número de brotes por tubo varió entre 2,1 y 2,9, dato que no es muy significativo.

### 3.2 Concentración de clorofilas a, b y carotenoides

La concentración de clorofila a para la variedad Aqua Blue va descendiendo a medida que aumenta el flujo de fotones, de manera que la menor concentración del pigmento se encontró en el T-4. En cambio, para Duel Violet se observó una disminución, seguida de un aumento de los niveles, de forma que la concentración de clorofila a en el T-4 quedó más alta en Duel Violet que en Aqua Blue. Destacar que para el tratamiento T-3 las concentraciones de clorofila a fueron muy similares (Fig. 6).

Los niveles de la clorofila b, mostraron la misma tendencia que la clorofila a en ambas variedades, apareciendo primero una bajada en la concentración para Aqua Blue a medida que aumentaba la iluminación, y un pequeño repunte en el T-4 para Duel Violet (Fig. 7). En la Fig. 7 también se puede observar que los valores de concentración de la clorofila b estuvieron muy próximos para el T-3.

Con respecto a la concentración de carotenoides totales (Fig. 8), se observó que al aumentar la iluminación Aqua Blue presentó una concentración elevada en T-2 para posteriormente bajar su concentración en T-4 de una manera acusada. Sin embargo, en Duel Violet la variación fue muy discreta, elevándose los valores a medida que aumentaba el flujo de

fotones, pero solo de una forma ligera. De nuevo, se pudo observar que para T-3 los valores de carotenoides en ambas variedades estuvieron cercanos, entre 6 y 8  $\mu\text{g/g}$  PF.

#### 4. Conclusiones

Cuando los niveles de pigmentos fotosintéticos son elevados, las plantas presentan una mejor adaptación a las condiciones ambientales del exterior de la cámara de cultivo. Por lo tanto, debería elegirse aquel tratamiento que asegure altas concentraciones de pigmentos, pero manteniendo unas tasas de propagación y una velocidad de crecimiento aceptables.

A pesar de ser consideradas las dos variedades de color azul, no responden igual a los tratamientos. Por lo tanto habría que considerar cada una de las variedades por separado para obtener un óptimo de producción y aclimatación.

Como no es posible establecer unas condiciones individualizadas por variedad en el interior de la cámara de cultivo, debido a los costes, se debe elegir un tratamiento que beneficie más a una, pero sin perjudicar demasiado a la otra, que este caso, parece ser el T-3.

El tratamiento T-3 tiene una distancia menor entre planta y foco emisor de luz que el T-2 (control). Utilizar este T-3 nos haría tener un mayor número de plantas en las cámaras de cultivo, debido a un mejor aprovechamiento del espacio, ya que las baldas de las estanterías podrían estar más juntas.

#### 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 bibliográficas

[1] Igawa, T., Hoshino, Y. & Mii, M. 2002. Efficient plant regeneration from cell cultures of ornamental statice, *Limonium sinuatum* Mill. In *Vitro Cell Dev-Pl.* 38: 157-162.  
 [2] Jeong, J.H., Murthy, H.N. & Paek, K. 2001. High frequency adventitious shoot induction and plant regeneration from leaves of statice. *Plant Cell Tiss. Org.* 65: 123-128.

[3] Xiao, Y. & Kozai, T. 2006. In vitro multiplication of statice plantlets using sugar-free media. *Sci. Hort-Amsterdam.* 109: 71-77.

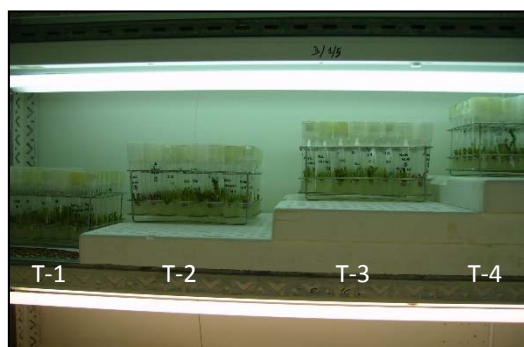
[4] Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* 15: 473-497.

[5] Lichtenthaler H.K., Wellburn A.R. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. T.* 11: 591-592.

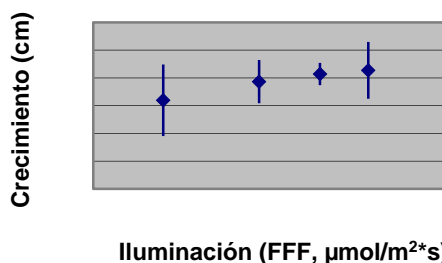
#### Tablas y Figuras

**Tabla 1.** Iluminación recibida por el material vegetal en los distintos los tratamientos

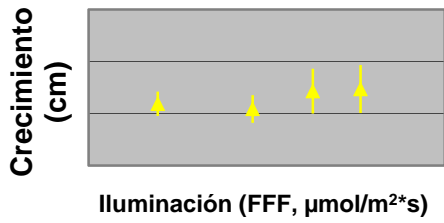
Tratamiento	Distancia (cm)	FFF ( $\mu\text{mol/m}^2\cdot\text{s}$ )
T-1	18,0	96,9
T-2	12,5	99,6
T-3	8,0	101,2
T-4	2,0	102,7



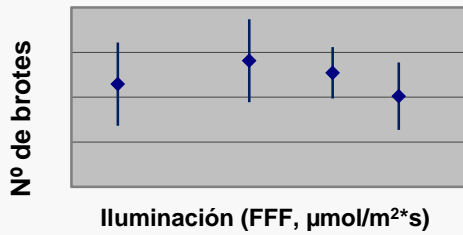
**Figura 1.** Disposición de los tratamientos en el ensayo



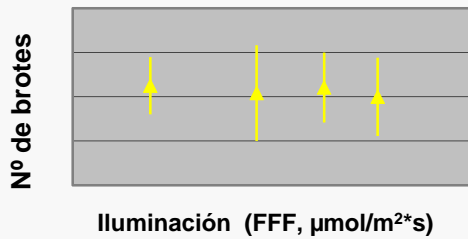
**Figura 2.** Efecto de la iluminación sobre el crecimiento de *Duel Violet*



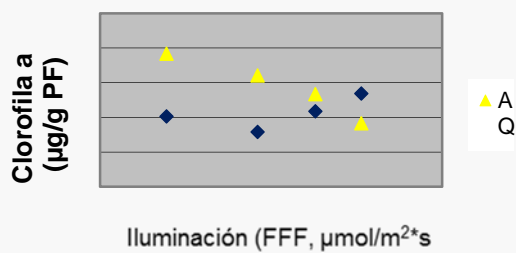
**Figura 3.** Efecto de la iluminación sobre el crecimiento de Aqua Blue



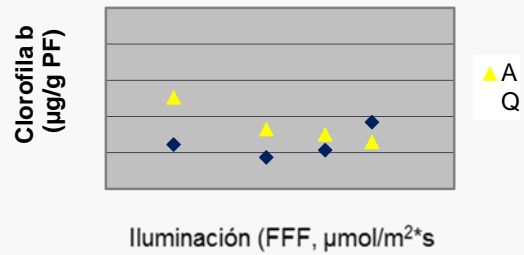
**Figura 4.** Efecto de la iluminación sobre la tasa de multiplicación de Duel Violet



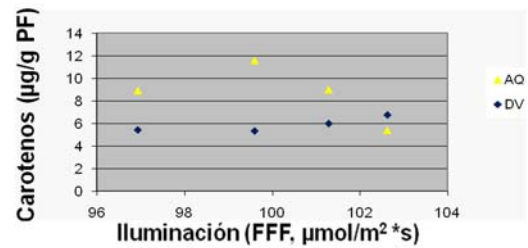
**Figura 5.** Efecto de la iluminación sobre la tasa de multiplicación de Aqua Blue



**Figura 6.** Efecto de la iluminación sobre los niveles de clorofila a en Duel Violet (DV) y Aqua Blue (AQ)



**Figura 7.** Efecto de la iluminación sobre los niveles de clorofila b en Duel Violet (DV) y Aqua Blue (AQ)



**Figura 8.** Efecto de la iluminación sobre los niveles de carotenoides en Duel Violet (DV) y Aqua Blue (AQ)

# SESIÓN III



## Producción Vegetal

### RESÚMENES

## Línea base de susceptibilidad y selección de poblaciones resistentes 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. lidiaGV\_ct@hotmail.com

### RESUMEN

La polilla del tomate, *Tuta absoluta*, es en la actualidad la plaga más importante del cultivo de tomate. El control químico es necesario para el control de esta plaga, por lo que hay que desarrollar estrategias que eviten el desarrollo de resistencias a los insecticidas eficaces para su control y desarrollar nuevos insecticidas compatibles con los enemigos naturales y polinizadores. En este trabajo se ha evaluado la susceptibilidad de distintas poblaciones de *T. absoluta* a los insecticidas lambda-cihalotrin y metil-clorpirifos. La concentración letal 50 (CL50) combinada para lambda-cihalotrin fue de 173,4 ppm y para metil-clorpirifos de 12 ppm. Estos valores pueden considerarse como la línea base de susceptibilidad para estos insecticidas. La variabilidad natural obtenida en *T. absoluta* para lambda-cihalotrin fue de 7,8 y para metil-clorpirifos de 4,2. También se están seleccionando poblaciones resistentes de *T. absoluta* a los insecticidas indoxacarb, metaflumizona y spinosad, para utilizarlos como modelos en los estudios de los mecanismos de resistencia.

**Palabras clave:** Polilla del tomate; control químico; estrategias; variabilidad natural.

### 1. Introducción

La polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick), es la plaga más importante del cultivo de tomate en el mundo debido a su rápida expansión y distribución geográfica [1]. *T. absoluta* es una plaga originaria de Sudamérica, donde se ha ido expandiendo desde mediados del siglo XX hacia las principales áreas del cultivo de tomate en el continente sudamericano. A finales de 2006, *T. absoluta* fue introducida en Europa desde Sudamérica a través de España [2], detectándose por primera vez su presencia en invernaderos de tomate en Castellón. En 2007, *T. absoluta* fue observada en todas las principales áreas del cultivo de tomate de España, y en 2008-2009, fue detectada en otros países de Europa. Las larvas de *T. absoluta* penetran en las hojas, tallos y frutos de la planta de tomate. Las larvas se alimentan del mesófilo de las hojas creando galerías, las cuales afectan a la fotosíntesis de la planta, dando lugar a una disminución de la producción de tomate [3]. Fig.1. El control químico es uno de los pilares básicos para el control de esta plaga. Es necesario desarrollar estrategias que eviten el desarrollo de resistencias a los pocos insecticidas eficaces para su control que existen en la actualidad, y a su vez que estos

insecticidas sean compatibles con los enemigos naturales y polinizadores. La estrategia de prevención de la resistencia debe basarse en la alternancia de productos con distintos mecanismos de resistencia. Para diseñar estas estrategias anti-resistencia a los nuevos productos ecocompatibles, es necesario conocer el estado actual de las resistencias en las poblaciones y estudiar los mecanismos de resistencia implicados.

Los objetivos de este trabajo son, por un lado, estudiar la susceptibilidad de poblaciones de *T. absoluta* a los insecticidas lambda-cihalotrin y metil-clorpirifos, para estudiar el potencial de resistencia que presentan dichas poblaciones a estos insecticidas, y como segundo objetivo, obtener poblaciones de *T. absoluta* resistentes a los insecticidas indoxacarb, metaflumizona y spinosad, para estudiar los mecanismos de resistencia implicados y las resistencias cruzadas con otros insecticidas presentes en el mercado.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Poblaciones de *Tuta absoluta*

Las poblaciones de *T. absoluta* fueron recolectadas de diferentes países de Europa (Tabla 1). Una vez en el laboratorio, las poblaciones fueron colocadas en jaulas de cría con planta de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv. Bobcat) para su alimentación. Las jaulas son mantenidas en el laboratorio en condiciones controladas de temperatura ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), humedad relativa ( $60\pm 5\%$ ) y fotoperiodo (16/8 luz/oscuridad).

### 2.2 Insecticidas

Las formulaciones comerciales de los insecticidas empleados en los bioensayos fueron: Spintor 480 SC (spinosad 48% w/v, Dow AgroSciences), Steward 30WG (indoxacarb 30% p/p, DuPont), Alverde (metaflumizón 24% p/v, BASF), Karate Zeon (lambda-cihalotrin 10% p/v, Syngenta) y Reldan\* E (metil-clorpirifos 22,4 % p/v, Dow AgroSciences).

### 2.3 Bioensayos de susceptibilidad

Estos bioensayos se realizaron con larvas L2 de *T. absoluta*. Para obtener la cantidad necesaria de larvas para los bioensayos, se cazan adultos de una jaula de cría y se introducen en jaulas con planta de tomate limpia durante 48 horas para que pongan huevos. Transcurrido este tiempo, los adultos son cazados de nuevo y colocados en su jaula de cría. Tras 8-12 días, aparecen las larvas L2 en la planta empleada para la puesta de los adultos.

El método de inmersión de hojas de tomate fue empleado para la realización de los bioensayos. Cada bioensayo se llevó a cabo con distintas concentraciones de los insecticidas a estudiar. Las hojas de tomate fueron cortadas y se sumergieron en las distintas concentraciones de insecticida. Cada concentración contenía Tween (0,05% v/v) como agente humectante no iónico. Después, las hojas se pusieron a secar. Cada hoja se colocó en una caja transparente (dimensiones 12x10x5 cm) con algodón saturado de agua en el peciolo de las hojas para evitar su deshidratación. Posteriormente, las larvas L2 de *T. absoluta* se sacaron con cuidado de las galerías de la planta de tomate empleada para la puesta de los adultos y se colocaron 10 larvas por caja. Los bioensayos se realizaron con 3 repeticiones por concentración y 10 larvas por repetición, con un total de 30 larvas por concentración de insecticida. Los ensayos se mantuvieron en condiciones controladas de

temperatura ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), humedad relativa ( $60\pm 5\%$ ) y fotoperiodo (16/8 luz/oscuridad). La mortalidad se evaluó tras 72 horas.

### 2.4 Bioensayos de selección de resistencia

Para los bioensayos de selección se partió de una misma población susceptible (Águilas), para asegurarnos que no hubiera ningún gen de resistencia. En estos bioensayos se empleó también el método de inmersión de hojas de tomate, y se realizaron con larvas L2. En este caso, se contaron las larvas L2 de la planta de tomate empleada para la puesta de los adultos, y se cortaron las hojas con las larvas en su interior para sumergirlas en la concentración de insecticida empleada para la selección. La mortalidad se evaluó tras 96 horas.

### 2.5 Análisis de los datos

En los bioensayos de susceptibilidad, la mortalidad de las larvas fue analizada usando el programa estadístico POLO-Plus. Este programa calcula, corrigiendo la mortalidad según la fórmula de Abbott (1925), la concentración letal 50 (CL50), la concentración letal 90 (CL90) y sus límites fiduciales al 95% para cada población e insecticida. También se calcularon los factores de resistencia (FR) de cada población, comparándola con la población más susceptible.

## 3. Resultados y Discusión

### 3.1 Susceptibilidad

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos de los bioensayos realizados con lambda-cihalotrin en poblaciones de *T. absoluta*. Los valores de CL50 fluctuaron entre 75,9 ppm para la población Cañada de Gallego, y 591,1 ppm para Águilas. Se observó una variabilidad de 7,8 veces entre la población más sensible y la menos susceptible (Factor de resistencia, FR). La CL50 combinada de todas las poblaciones para lambda-cihalotrin fue de 173,4 ppm. Este dato puede considerarse como la línea base de susceptibilidad de *T. absoluta* para lambda-cihalotrin. También se observó que la CL90 combinada de lambda-cihalotrin (3227 ppm) estaba por encima de su dosis de campo (20 ppm), por lo que parece que este insecticida es poco eficaz frente a las poblaciones de *T. absoluta* bioensayadas.

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos de los bioensayos realizados con metil-clorpirifos en poblaciones de *T. absoluta*. Los valores de CL50 fluctuaron entre 5,8 ppm

para la población Almería, y 24,3 ppm para Cañada de Gallego. Se observó una variabilidad de 4,2 veces entre la población más sensible y la menos susceptible. La CL50 combinada de todas las poblaciones para metil-clorpirifos fue de 12 ppm. Este dato puede considerarse como la línea base de susceptibilidad de *T. absoluta* para metil-clorpirifos. También se observó que la CL90 combinada de metil-clorpirifos (76,3 ppm) estaba por debajo de su dosis de campo (896 ppm), siendo este insecticida bastante eficaz frente a las poblaciones de *T. absoluta* bioensayadas.

### 3.2 Selección de resistencias

La respuesta de *T. absoluta* a la selección de los insecticidas indoxacarb, spinosad y metaflumizona se presenta en la Tabla 4. Para indoxacarb y spinosad, se fueron aumentando las concentraciones de insecticida, hasta alcanzar la selección 8, en donde se tuvieron que bajar concentraciones debido al aumento de la mortalidad. Esto posiblemente se deba a que se está reduciendo la población seleccionada y aumentando la consanguinidad de los individuos. En el caso de metaflumizona, se fueron aumentando las concentraciones de insecticida hasta alcanzar una selección 7 tratada a 10 ppm.

### 4. Conclusiones

En los bioensayos de susceptibilidad de poblaciones de *T. absoluta* a lambda-cihalotrin y metil-clorpirifos, las variabilidades obtenidas entre las poblaciones están dentro de la variabilidad natural esperable, ya que ha sido una misma población invasiva de *T. absoluta* la que ha colonizado todo el Mediterráneo.

Para las poblaciones seleccionadas a indoxacarb, spinosad y metaflumizona, seguiremos seleccionando y realizando bioensayos para determinar el nivel de resistencia adquirido.

### 5. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2011-25164) y los fondos europeos FEDER, y parcialmente por IRAC España.

[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. Mol. Biol.* 42: 506-513.

[2] Silva, G.A., Picanço, M.C., Bacci, L., Crespo, A.L.B., Rosado, J.F., Guedes, R.N.C. 2011. Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*. *Pest Manag. Sci.* 67: 913-920.

[3] Desneux, N., Wajnberg, E., Wyckhuys, K.A.G., Burgio, G., Arpaia, S., Narváez-Vasquez, 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.

### Tablas y Figuras

**Tabla 1.** Poblaciones de *T. absoluta* bioensayadas.

Población	Origen	Fecha de recogida	Cultivo
Abarán	Murcia (España)	Marzo 2010	Tomate
Almería	Almería (España)	Mayo 2010	Tomate
Canarias	Las Palmas de Gran Canarias (España)	Mayo 2010	Tomate
Níjar	Almería (España)	Mayo 2010	Tomate
Cañada de Gallego	Murcia (España)	Mayo 2010	Tomate
Biancavilla	Sicilia (Italia)	Julio 2010	Tomate
Tudela	Navarra (España)	Septiembre 2010	Tomate
Boavista	Oporto (Portugal)	Septiembre 2010	Tomate
Charneca	Lisboa (Portugal)	Septiembre 2010	Tomate
Águilas	Murcia (España)	Enero 2011	Tomate
Foggia	Foggia (Italia)	Marzo 2011	Tomate
Mazarrón	Murcia (España)	Julio 2012	Tomate
Fossano	Fossano (Italia)	Julio 2012	Tomate
Francia	Villeneuve de la Raho (Francia)	Septiembre 2012	Tomate
Grecia	Heraklion (Grecia)	Noviembre 2012	Tomate

**Tabla 2.** Susceptibilidad de *T. absoluta* a lambda-cihalotrin

### 6. Referencias bibliográficas





# Susceptibilidad de poblaciones europeas de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) a insecticidas y respuesta a la selección

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

Protección de Cultivos. Departamento de Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena. 30203 Cartagena. Charo\_martinez\_aguirre@hotmail.com

## RESUMEN

El control integrado de plagas basado en los agentes de control biológico se ha impuesto en los cultivos hortícolas intensivos. Sin embargo, estos protocolos siguen requiriendo de los fitosanitarios. Para mantener y aumentar la eficacia de estos programas es vital la prevención del desarrollo de resistencias a los productos insecticidas utilizados. *Tuta absoluta* (Meyrick), comúnmente conocida como la polilla del tomate, es un reto fitosanitario de la horticultura intensiva, poniendo en riesgo los programas de control integrado en el cultivo de tomate desde su aparición en 2006 en España y su rapidísima extensión. Se estudió la susceptibilidad de poblaciones de tuta procedentes del área mediterránea (España, Portugal, Grecia, Francia e Italia) a los insecticidas emamectina benzoato y azadiractina. La concentración letal 50 (CL50) combinada para emamectina benzoato fue 0,014 ppm, siendo para azadiractina de 2,96 ppm. Estos valores pueden considerarse como la línea base de susceptibilidad para futuros estudios del desarrollo de resistencias a estos compuestos. La variabilidad natural entre poblaciones fue 3,2 para emamectina, lo que puede considerarse como normal incluso bajo. A pesar de obtener una variabilidad de 12,4 para azadiractina, sigue siendo un valor dentro de lo esperado. Se observa respuesta a la selección para emamectina y flubendiamida, con un aumento de la resistencia de 3,7 y 8,6 puntos en la CL50 y CL90 desde la S0 a la S6 para emamectina. Siendo para flubendiamida de 5 y 13, desde la S0 hasta la S6. No teniendo datos para clorfaniliprol.

**Palabras clave:** resistencia; tomate; diamidas; emamectina; azadiractina

## 1. Introducción

*T. absoluta* es una plaga muy invasiva, que no solo alcanza niveles poblacionales elevados, sino que además se ha expandido de forma muy rápida, invadiendo en tres años toda España, norte de África y gran parte de Europa [1]. Además, en los países donde está presente se ha convertido en una de las plagas clave del cultivo [2,3].

Desde las primeras observaciones se mostró como una plaga muy agresiva, causando importantes daños en hojas y frutos del cultivo del tomate [4]. Además, la polilla del tomate se refugia en otras especies vegetales como la berenjena (*Solanum melongena*), *Solanum nigrum*, *Solanum tuberosum*, *Chenopodium murale*, *Nicotiana glauca* y *Phaseolus vulgaris* [5].

Uno de los objetivos de este trabajo es estudiar la susceptibilidad inicial de poblaciones de *T. absoluta* procedentes de España, Portugal, Grecia, Francia e Italia a emamectina benzoato y azadiractina. Así se ha obtenido la línea base de susceptibilidad, para futuros estudios del desarrollo de resistencias a estos compuestos.

El otro objetivo consiste en seleccionar poblaciones resistentes a clorfaniliprol, flubendiamida y emamectina benzoato.

## 2. Materiales y Métodos

Los bioensayos de susceptibilidad y de selección se realizaron en larvas de segundo estadio (L2). El material vegetal utilizado fue *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Bobcat

## 2.1 Bioensayo de susceptibilidad

Para sincronizar la oviposición y tener las L2, 10 - 12 días previos al bioensayo se ponen los adultos de tuta, de la población objeto de estudio, sobre planta limpia durante 48 horas. Cuando las larvas se encuentran en L2, se extraen. A continuación, se tratan 3 hojas de tomate de planta limpia por concentración, y se ponen 10 L2 sobre cada hoja obteniendo un total de 3 repeticiones de 10 larvas por concentración. A las hojas se les pone algodón húmedo en el peciolo. Fig. 1. 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.

## 2.2 Bioensayo de selección

Para llevar a cabo estos bioensayos, se procede a la sincronización de la oviposición, al igual que en apartado anterior. Una vez que las larvas se encuentran en segundo estadio, se cuentan todas las larvas que hay en la planta limpia. Después, se cortan todas las hojas de la planta y se sumergen, con las larvas en su interior, en la concentración preparada. Una vez que las hojas están secas, se introducen en envases del mismo tipo que los usados en los bioensayos de susceptibilidad. Transcurridas 96 horas se lee el bioensayo y se diferencia entre larvas vivas, muertas o moribundas (se contarán como muertas). Las larvas vivas y moribundas se pondrán sobre planta limpia y se procederá a su cría.

## 3. Resultados y Discusión

### 3.1 Susceptibilidad

La línea base de susceptibilidad de las 11 poblaciones europeas (Tabla 1) estudiadas para emamectina benzoato es de 0,014 (0,012 – 0,016) ppm. A excepción de una población (Boavista), no se encuentran diferencias significativas entre poblaciones. De hecho, la variabilidad natural (factor de susceptibilidad) es un valor que se puede considerar bajo, 3,22 (Tabla 2).

Sin embargo, en azadiractina se observa más variabilidad. Aún así, sucede lo mismo que en el caso anterior, a excepción de dos poblaciones no hay diferencias significativas. En este caso la CL50 combinada corresponde a 2,96 (2,21 –

3,81) ppm. El factor de susceptibilidad se encuentra dentro de los valores esperados (12,4) (Tabla 3).

Se observa que, aunque se han estudiado poblaciones con diferentes orígenes, no se encuentran diferencias significativas en los resultados. Esto puede ser debido a que fue una única población la que invadió la península procedente de Sudamérica [4].

### 3.2 Respuesta a la selección

La respuesta a la selección de emamectina (Tabla 4), muestra una disminución de 3,7 veces la susceptibilidad para los datos obtenidos de la CL50 (0,01 ppm) de la población de partida (S0), respecto a la CL50 (0,037 ppm) de la selección 6 (S6). Respecto a la CL 90, también se observa un aumento de 8,6 de la resistencia desde la S0 (0,033 ppm) a la S6 (0,285 ppm).

Para clorraniliprol no se ha realizado bioensayo todavía (Tabla 5), pero comparando los resultados de la S5 con los de la CL90 de la Tabla 4, se puede intuir que no se está seleccionando. Esto es así porque la CL 90 es de 0,65 ppm y la mortalidad entre 0,4 - 0,8 ppm es del 91%.

Respecto a flubendiamida, también se observa que tras varias selecciones, la población es menos susceptible. Esto se observa en la Tabla 6. La CL50 de la S0 (0,1 ppm) es casi 5 veces menor que la CL 50 de la S5. Y para la CL90, 13 veces.

## 4. Conclusiones

### 4.1 Susceptibilidad

La línea base obtenida para emamectina es de 0,014 (0,012 – 0,016) ppm y para azadiractina de 2,96 (2,21 – 3,81) ppm. En ambos productos, bioensayos en poblaciones de diferentes países, no se encuentran diferencias significativas entre poblaciones. Y el factor de susceptibilidad se encuentra dentro de lo esperado (3,22 y 12,4 respectivamente).

### 4.2 Respuesta a la selección

Las poblaciones seleccionadas a emamectina benzoato y flubendiamida están teniendo una respuesta positiva a los tratamientos. Han multiplicado su resistencia en 3,7 y 5 para la CL50, respectivamente. Y para la CL 90, los resultados son más expectantes aún, han multiplicado la resistencia por 8,6 y 13, respectivamente.

Para clorantraniliprol todavía no se ha realizado bioensayo para verificar si se está seleccionando, pero observando los datos se puede intuir que esto no es así.

## 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 bibliográficas

- [1] Vercher, R., 2010. *Tuta absoluta* (Meyrick), la nueva plaga invasora del tomate. Actas del III Congreso de Especies Exóticas Invasoras (en prensa).
- [2] Picanço, M.C., D.J.H. Silva, G.L.D. Leite, A.C. Mata & G.N. Jham. 1995. Intensidade de ataque de *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) ao dosel de três espécies de tomateiro. Pesq. Agropec. Bras. 30: 429 – 433.
- [3] Estay, P., Bruna, A. 2002. Insectos, Ácaros y Enfermedades asociadas al Tomate en Chile. Colección libros INIA N° 7. Santiago-Chile.
- [4] García-Marí, F. y Vercher, R. 2010. “Descripción, origen y expansión de *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae).” Phytoma España, N° 127. Pág. 16.
- [5] Blom, J. Robledo, A. Torres, S. 2011. “Control de *Tuta absoluta* mediante medidas culturales”. Documentos Técnicos 04. Pág. 8.

## Tablas y Figuras

**Tabla 1.** Origen y nombre de las poblaciones estudiadas

País de origen	Procedencia	Nombre de la población
España	Andalucía (Almería)	Níjar
	Andalucía	Almería
	Las Palmas de Gran Canarias	Canarias
	Murcia	Águilas
	Murcia	Mazarrón
	Murcia	Abarán
	Murcia (Mazarrón)	Cañada de Gallego
	Navarra	Tudela

Italia	Italia	Foggia
	Sicilia	Biancavilla
Portugal	Fossano	Fossano
	Oporto	Boavista
Francia	Lisboa	Charneca
	Villeneuve de la Raho	Francia
Grecia	Heraklion	Grecia

**Tabla 2.** CL50 de las diferentes poblaciones estudiadas, factor de susceptibilidad y línea base de emamectina.

	CL50 (ppm)	lim inf	lim sup	Factor de susceptibilidad
Boavista	0,027	0,019	0,059	3,22
Abarán	0,025	0,016	0,063	2,92
Biancavilla	0,018	0,012	0,033	2,13
Foggia	0,014	0,009	0,025	1,67
Águilas	0,013	0,010	0,016	1,52
Canarias	0,012	0,006	0,017	1,36
Níjar	0,011	0,008	0,016	1,34
Tudela	0,011	0,007	0,015	1,26
Almería	0,010	0,005	0,016	1,19
Charneca	0,009	0,005	0,017	1,09
C. Gallego	0,009	0,005	0,012	1,00
<b>Línea base</b>	<b>0,014</b>	<b>0,012</b>	<b>0,016</b>	

**Tabla 3.** CL50 de las diferentes poblaciones estudiadas, factor de susceptibilidad y línea base de azadiractina.

	CL50 (ppm)	lim inf	lim sup	Factor de susceptibilidad
Boavista	7,28	1,21	24,73	12,36
Charneca	5,92	2,64	11,37	10,05
Abarán	5,25	1,38	13,78	8,92
Almería	3,81	1,98	6,25	6,47
Foggia	3,45	0,76	8,23	5,87
Biancavilla	3,19	0,506	8,592	5,43
Canarias	2,81	0,390	6,771	4,78
Águilas	2,18	1,197	3,536	3,71
C. Gallego	1,87	0,487	4,024	3,19
Tudela	1,32	0,223	3,089	2,26
Níjar	0,58	0,031	1,653	1,00
<b>Línea base</b>	<b>2,96</b>	<b>2,21</b>	<b>3,81</b>	

**Tabla 4.** Respuesta a la selección de emamectina

EMAMECTINA	Selección (nº larvas)	ppm	Mortalidad estimada (%)
------------	-----------------------	-----	-------------------------

<b>CL50: 0,01 ppm</b>	S0	0,02	no estimada
	S1	0,1	no estimada
<b>CL90: 0,033 ppm</b>	S2 (522)	0,02–0,15	76
	S3 (1.085)	0,05–0,1	87
	S4 (1.340)	0,05–0,1	94
	S5 (51.156)	0,1–0,3	82
	<b>Bioensayo</b>		
<b>CL50: 0,037ppm</b>	S6 (2.007)	0,05	95
<b>CL90: 0,285 ppm</b>			
	S7 (1.185)	0,1-0,7	98

**Tabla 5.** Respuesta a la selección de clorantraniliprol

<b>CLORANTRANILIPROL</b>	<b>Selección</b>	<b>ppm</b>	<b>Mortalidad estimada (%)</b>
<b>CL50: 0,18 ppm</b>	S0 (471)	0,2	54
	S1 (929)	0,4	89
<b>CL90: 0,65 ppm</b>	S2 (502)	0,8	96
	S3 (4.919)	0,8-1	98
	S4 (2.084)	0,4-1	99
	S5 (576)	0,4-0,8	91

**Tabla 6.** Respuesta a la selección de flubendiamida

<b>FLUBENDIAMIDA</b>	<b>Selección</b>	<b>ppm</b>	<b>Mortalidad estimada (%)</b>
<b>CL 50: 0,1 ppm</b>	S0 (457)	0,15	35
	S1 (424)	0,2-0,3	64
	S2 (898)	0,4-0,5	79
	S3 (1.195)	0,8	87
	S4 (6.195)	0,9-1	98
<b>Bioensayo S5</b>			
<b>CL 50: 0,49 ppm</b>	S5 (1.057)	1,2	97
<b>CL 90: 5,35 ppm</b>			



**Figura 1.** Envases plásticos transparentes con hojas de tomate y larvas en su interior.

# Estudio técnico- jurídico de los residuos mineros en relación a la normativa de residuos y suelos contaminados: el caso español

M.G. Rosique-López <sup>(1)</sup>, G. García-Fernández <sup>(1)</sup>, T.M. Navarro-Caballero <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria. ETSIA. Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30204 Cartagena (Murcia), España. [guadalupe.rosique@gmail.com](mailto:guadalupe.rosique@gmail.com)

<sup>(2)</sup> Departamento de Derecho Administrativo. Facultad de Derecho Universidad de Murcia, Calle Santo Cristo 1, 30001 Murcia, España.

## RESUMEN

El suelo es un recurso no renovable, dinámico, afectado por fuentes de contaminación que lo pueden convertir en un recurso contaminado. El contenido en metales pesados del suelo es uno de los criterios empleados para la estimación de la calidad ambiental del suelo, siendo necesario, el establecimiento de niveles de fondo en los metales y sus correspondientes niveles genéricos de referencia. El suelo tiene unos valores naturales de presencia de determinados elementos traza, metales, que son conocidos como valores de fondo, que generan un riesgo admisible. Pero cuando ese riesgo se convierte en inadmisibles, se han de establecer otros valores que nos indiquen ese umbral. Estos valores serían los niveles genéricos de referencia del suelo, y son los valores que nos indicarán si estamos ante un suelo potencialmente contaminado, o contaminado. Los "elementos traza" tales como los siguientes metales pesados (Zn, Pb, Co, Cu y As), aparecen mayoritariamente en los residuos mineros relativos a las industrias extractivas. Estos materiales ya sean residuos, recursos o subproductos reciben, por lo general, el tratamiento de residuos inertes, cuando en realidad deberían ser tratados como materiales peligrosos, por su carácter tóxico. Por tanto, el presente estudio persigue el realizar un análisis crítico de las disposiciones normativas que regula los residuos y suelos propios de los distritos de minería, metálica básicamente, con la finalidad de proponer mejoras normativas que permitan la adecuación de la legislación aplicable a los nuevos conocimientos científico-técnicos, así como a todos los aspectos relacionados con la minimización de riesgos y salud ambiental.

**Palabras clave:** residuos y suelos de minería, toxicidad, consideración jurídica, elementos traza (metales); implicación legal; minimización de riesgos, salud ambiental.

## 1.-Introducción

Esta investigación parte de la idea de que España es un país que no se ha caracterizado históricamente por su concienciación en la necesidad de proteger el suelo. A este respecto, la consideración de residuo en la legislación tanto a nivel comunitario, como estatal se basa en definiciones poco claras y de difícil comprensión.

En consecuencia, elaboramos un estudio de la normativa existente relativa a suelos contaminados y residuos mineros, tanto a nivel

comunitario, estatal y de comunidades autónomas, así como la consulta de Jurisprudencia relativa a este tema. Por otro lado, también se hace un estudio de los artículos científicos publicados relativos tanto de suelos contaminados como de residuos mineros. Por último, y a modo de corolario, a la luz de las carencias técnicas y jurídicas que se han puesto de manifiesto tras el estudio y análisis de la legislación actual, se propone que dichas carencias sean tenidas en cuenta para futuras disposiciones normativas.

## 2. Materiales y Métodos.

### 2.1 Materiales

Los materiales utilizados para este trabajo han consistido en la búsqueda y estudio de bibliografía en todo lo relativo a artículos publicados sobre suelos contaminados y residuos mineros. Igualmente, se ha recurrido al análisis de las disposiciones normativas relativo a los residuos mineros y suelos contaminados.

### 2.2 Métodos

El análisis comparado entre los conocimientos científico-técnicos, la Jurisprudencia y las disposiciones normativas, relativos a suelos contaminados y residuos mineros, ha sido la base de este trabajo. De este modo, se han intentado localizar las carencias normativas existentes en la legislación aplicable actualmente, en relación a su poca adecuación respecto de las características y comportamiento de los suelos y residuos de zonas de minería, conforme a los conocimientos científicos y técnicos actualmente disponibles. Para ello, en todo momento, se ha tenido como prioridad la minimización de los riesgos para la salud ambiental del entorno de estas zonas mineras, así como la valorización de estos residuos como posible fuente de recursos.

## 3. Resultado y Discusión

Los resultados obtenidos se han derivado de la revisión de las fuentes referidas en el apartado anterior, en materia de industrias extractivas, Ley de Minas y Reales Decretos 975/2009 y 777/2012 relativas a la protección y rehabilitación de espacios mineros y de residuos y suelos contaminados (Ley 22/2011). La consideración de un suelo contaminado debe tener en cuenta los valores de fondo, que es el contenido natural de metales propios de cada región edafogeológica, así como los niveles genéricos de referencia (NGR) (Martínez-Sánchez y Pérez-Sirvent, 2007) y (Gómez-Ros *et al.*, 2013), que se definen para cada sustancia como la concentración de una sustancia contaminante en el suelo que no conlleva un riesgo superior al máximo aceptable para la salud humana o los ecosistemas. Estos niveles genéricos de referencia se calculan de acuerdo con los criterios recogidos en el anexo VII del Real Decreto 9/2005, y los mismos nos permiten la elaboración de riesgos de esa toxicidad por la

exposición hasta que los valores de 100xNGR, a partir de los cuales se consideran ambientes totalmente, contaminados. El intervalo entre los niveles de fondo y los NGR, constituye el rango de concentración de estos elementos que conlleva un riesgo admisible para la población y o ecosistemas. Los NGR están regulados por normativa internacional y de comunidades autónomas. A nivel nacional, no se dispone de normativa al respecto, si bien el Real Decreto 1310/1990, que regula los lodos de depuración del sector agrícola, fija los niveles máximos en suelos y lodos para algunos metales pesados y elementos traza, tales como son el Zn, Pb, Cu, Co y As. Lo importante, por tanto, es la forma en la que el material se acaba clasificando, ya sea como residuo inerte o como residuo peligroso. En el primer caso, estos residuos no necesitarían de un tratamiento específico, mientras que si se considera como residuo peligroso estos materiales necesitan una gestión adecuada de los mismos. El Real Decreto 777/2012 recoge en su Anexo I (Fig. 1) una serie de residuos relativos a la minería que son considerados como inertes. De este modo, habría que considerar como residuos inertes, a aquellos residuos con contenidos en metales pesados y metaloides que no superen los valores mínimos, tanto los que se encuentran regulados como tales en la Lista Europea de Residuos (LER) con el código 01, relativo a la minería metálica, como los que no superen los niveles genéricos de referencia (NGR) de las CCAA que así lo tienen legislado, las que no se le aplica la fórmula EPA (Fig.2). Como inertes, cumplen una serie de características detalladas en las tablas del Anexo I, se aplica el art 3.7.e del RD 975/2009 y el subapartado 1.1.2 d) donde serán los metales (As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb, V y Zn) lo suficientemente bajos como para que el riesgo sea admisible. Llegados a este punto, nos preguntamos, qué pasa con aquellos residuos con contenidos en metales pesados y metaloides que superan los niveles mínimos citados anteriormente. A este respecto, habría que concluir que estos residuos, en primer lugar, no deberían ser considerados como residuos inertes, sino que profundizando deberían ser peligrosos. Si se continúa con el análisis del anexo I el RD 777/2012, se llega a la metodología que esta normativa propone para la realización de las pruebas de los residuos de industrias extractivas para su clasificación como "peligrosos", que a su vez estará sujeta a la normativa sobre residuos peligrosos. Así para la caracterización de estos residuos peligrosos aplicamos la Decisión de la Comisión (2009/360/CE)Y en cuanto a la

manipulación de los residuos se debe tener en cuenta la identificación y clasificación de los residuos según la Lista Europea de Residuos, publicada mediante la Orden MAM/304/2002. Dicha lista es una lista armonizadora de residuos que se revisará periódicamente a la luz de nuevos acontecimientos, incluidas sus características peligrosas tal como se establece en dicha Orden Ministerial y en el anexo III de la ley 22/2011, que se ocupa de las características de los residuos que permiten calificarlos como peligrosos. En la LER se entienden como peligrosos aquellos que llevan un asterisco (\*) tras el código, tal y como son los siguientes residuos que se incluyen en el grupo 01 03 denominado como “Residuos de la transformación física y química de minerales metálicos”. La Decisión 2000/532/CE <sup>[7]</sup> expone un listado de sustancias peligrosas al que hace referencia la Ley 22/2011 en su art 6. Resaltar que en el anexo apartado 4, todo residuo que lleve (\*) está sujeto a la Directiva 91/689/CEE de residuos peligrosos y el apartado 5 cita como “metal pesado” siempre que este clasificado como sustancia peligrosa. Esta Decisión sufre una modificación por parte de la Decisión 2001/118/CEE, e introduce una serie de códigos relativos a la industria extractiva de la minería metálica. Con posterioridad, sufre dos modificaciones (Decisión del Consejo 2001/119 de 22 de enero y Decisión Consejo 2001/573, de 23 de julio), recogidas por la Orden Ministerial MAM 304/2002, ya citada. Así, al comparar esta nueva lista con la LER de la Decisión 2000/532/CE, se puede comprobar que hay códigos que han sido eliminados y dejados de ser considerados residuos como tal, como por ejemplo es el caso del código “01 03 01. Estériles”, que antes se consideraban inertes y ahora han pasado a ser considerados como residuos peligrosos en aquellos casos en los que contienen sustancias peligrosas (01 03 05\*), o sulfuros (01 03 04\*). La lista de residuos será vinculante para la determinación de los residuos que han de considerarse residuos peligrosos. La inclusión de una sustancia u objeto en la lista no significará que deba considerarse residuo en todas las circunstancias. Una sustancia u objeto se considerará residuo únicamente cuando corresponda a la definición del artículo 3, punto 1 de la ley 22/2011. Conforme a esto, los residuos de minería metálica recogidos en el LER con el código “010101. Residuos de extracción de minerales metálicos” no aparecen recogidos como inertes en el anexo I el RD 777/2012, por lo que se estaría en disposición de considerarlos como residuos no inertes. No obstante, y en el

supuesto de que estos residuos fuesen no inertes, podrían ser residuos peligrosos. En consecuencia, surge aquí la pregunta de qué ocurre con los residuos afectados por el código “010101. Provenientes de la extracción de minerales metálicos” que no son inertes, pero que tampoco aparecen con el (\*) que los identificaría como residuos peligrosos, y que superan los niveles y valores anteriormente referenciados (valores límite y niveles genéricos de referencia) como para ser considerados como peligrosos. Además, para ser residuo peligroso según el Art. 6.2 de la Ley 22/2011, se podrá considerar un residuo como peligroso cuando, aunque no figure en la lista como tal, presente una o más de las características indicadas en el Anexo III. Entre estas características se destaca H6 (Tóxico) y H7 (Cancerígeno), en cuanto a los residuos relativos a las industrias extractivas. Pero sin embargo este carácter no aparece reflejado en la normativa aplicable (RD 777/2012 y Decisión 2000/532/CE). Consecuentemente, se hace necesario una implementación de la consideración de los aspectos toxicológicos asociados a estos materiales derivados de la minería metálica, en la legislación que los regula de tal modo que se asegure, por un lado su adecuada gestión, y por otro que se minimicen los riesgos de salud ambiental asociados a los mismos. Además de todo lo expuesto anteriormente, cabría ahora discutir el carácter de los residuos de minería metálica, además de cómo peligroso o no, como recurso, subproducto o estrictamente como residuo, ya que dependiendo de la consideración que se le aplique las consecuencias de índole práctico, económico y ambiental serán muy dispares. Ya que la consideración jurídica para los tres supuestos es totalmente distinta, en tanto y en cuanto que los residuos (el suelo contaminado es tratado como residuo: STJUE 7/09/2004<sup>[3]</sup>), están regulados por todo el marco normativo anteriormente descrito, mientras que para el caso de los subproductos de producción, SSTJUE 15/06/2000<sup>[4]</sup>, 18/04/2002<sup>[5]</sup> y 11/09/2003<sup>[6]</sup>, y de los recursos la normativa de aplicación es totalmente diferente, entre otras cuestiones por la introducción del epíteto “peligroso” a la hora de describir a estos materiales. Por tanto, nos encontramos ante la paradoja de que unos mismos materiales minerales puedan o no tener la consideración de peligrosos (residuo peligroso STJUE 7/03/2013<sup>[7]</sup>); por lo que, sería conveniente el tener en consideración esta cuestión para los posibles cambios normativos

que pudiesen abordarse sobre este campo en un futuro.

#### 4. Conclusiones

Se puede concluir que la no existencia de regulaciones, tanto de los niveles de fondo como en los NGR en todas las Comunidades Autónomas, dificulta el poder aplicar, de forma efectiva, una normativa específica al respecto.

Por otro lado, la consideración de los residuos de la minería, incluida la metálica, conforme a la Lista Europea de Residuos vigente con el carácter de no peligrosos, y por tanto sin (\*), hace que los mismos permanezcan en un limbo jurídico en el marco normativo español.

En consecuencia, parece necesaria la revisión de una normativa que parece anticuada en lo relativo a la minería y poco desarrollada en cuanto a la gestión de las industrias extractivas en lo referente a materiales peligrosos.

Por último, resaltar que la Jurisprudencia es escasa en materia de consideración de suelo contaminado, y prácticamente nulo en lo relativo a la minería metálica. A este respecto, existe solo alguna jurisprudencia emitida por el Tribunal de Justicia de la Unión Europea a la hora de intentar clarificar el concepto de subproducto de industrias extractivas frente al concepto de residuo.

#### 5. Agradecimientos

Agradecer al equipo del TAIDAA el poder formar parte de este grupo de doctorado.

#### 6. Referencias bibliográficas

[1] Martínez-Sánchez y Pérez-Sirvent, 2007 Martínez Sánchez, M.J, Pérez Sirvent. C. (2007). Niveles de fondo y niveles genéricos de referencia de metales pesados en suelos de la Región de Murcia. Secretaria Autonómica para la Sostenibilidad. Dirección General de Calidad Ambiental. 296pp.

[2] Gómez-Ros *et al.*, 2013 Gómez Ros .J M., García. G., Peñas. J.M., (2013). Assessment of restoration success of former metal mining areas after 30 years in a highly polluted Mediterranean mining area: Cartagena-La Union.

[3] STJCE de 7 de septiembre de 2004 (C-1/03), *Van de Walle*: conceptos de “residuo”, “productor de residuos” y de “poseedor de residuos”.

[4] STJCE de 15 de junio de 2000 (C-418/97 y C-419/97); *ARCO*: concepto de residuo: acción de “desprenderse” y Anexo II.B DM. Doctrina de los indicios para que las autoridades nacionales distingan entre residuo y residuo de producción.

[5] STJCE de 18 de abril de 2002, (C-9/00); *Palin Granit Oy*: concepto de residuo. El propio Tribunal comienza a aplicar la “doctrina de los indicios”: la ganga minera es residuo.

[6] STJCE de 11 de septiembre de 2003 (C-1146/01), *Avesta Polarit Chrome Oy*: concepto de residuo y ámbito de aplicación (art. 2.1.b DM). La ganga minera puede no ser considerada residuo en determinadas circunstancias.

[7] STJUE de 7 de marzo de 2013. Asunto C-358/11.Reglamento Reach (residuo peligroso).

#### Tablas y Figuras.

**Figura 1. Anexo I. RD 777/2012. Lista residuos inertes.** Código 01.Residuos de prospección, extracción de minas y canteras y tratamientos físicos y químicos de minerales.

01 01 Residuos de la extracción de minerales.

01 01 02 Residuos de la extracción de minerales no metálicos.

01 04 Residuos de la transformación física y química de minerales no metálicos.

01 04 08 Residuos de grava y rocas trituradas distintos de los mencionados en el código 01 04 07.

01 04 09 Residuos de arena y arcillas.

01 04 10 Residuos de polvo y arenilla distintos de los mencionados en el código 01 04 07.

01 04 12 Estériles y otros residuos del lavado y limpieza de minerales, distintos de los mencionados en los códigos 01 04 07 y 01 04 11.

01 04 13 Residuos del corte y serrado de piedra distintos de los mencionados en el código 01 04 07.

01 05 Lodos y otros residuos de perforaciones.

01 05 04 Lodos y residuos de perforaciones que contienen agua dulce.

#### Figura 2.Fórmula EPA.

$NR = NF + n DE$  NR= nivel de referencia, NF= nivel de fondo, DE= desviación estándar de la media de los valores de fondo propios de la zona.



## Variabilidad de la tolerancia a insecticidas en distintas 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, España. virgi.balanza@upct.es

### RESUMEN

*Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) es un enemigo natural usado ampliamente en el control biológico de plagas, principalmente del trips *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). La instalación y establecimiento de *O. laevigatus* en los cultivos resulta de vital importancia, pero en ocasiones existen problemas de compatibilidad con algunos tratamientos fitosanitarios. Este problema siempre se ha abordado desde el punto de vista del plaguicida, estudiando la compatibilidad de los productos y utilizando únicamente aquéllos que son compatibles. En este caso, este trabajo pretende abordar el problema desde el punto de vista del enemigo natural, realizando la selección de una población con una resistencia a plaguicidas mejorada. Para ello estudiamos si existe una variabilidad genética entre varias poblaciones naturales de *O. laevigatus* en el mediterráneo en su tolerancia a diversos insecticidas. Los insecticidas utilizados fueron: tiametoxam, imidacloprid e indoxacarb. Tiametoxam resultó ser el más tóxico que imidacloprid, aun siendo ambos neonicotinoides. No existieron diferencias significativas entre poblaciones para tiametoxam, sin embargo sí se observaron diferencias significativas (12 veces) entre poblaciones para imidacloprid. Indoxacarb fue más tóxico que imidacloprid y menos que tiametoxam, pero en ninguno de los casos la CL<sub>50</sub> fue superior a la dosis de aplicación en campo. Para indoxacarb también se observaron diferencias significativas entre poblaciones (5 veces).

**Palabras clave:** GIP, resistencia a insecticidas, *O.laevigatus*.

### 1. Introducción

*O. laevigatus* es un enemigo natural de muchas plagas de artrópodos pero ha sido usado principalmente en el control biológico del trips *Frankliniella occidentalis* (Pergande) [1]. Este antocórido ha sido usado como agente de control biológico en la protección de cultivos en muchos países europeos [2].

La instalación, establecimiento y posterior distribución en los invernaderos de *O. laevigatus* resulta de vital importancia en el éxito del manejo integrado de plagas [3]. Un principio clave del manejo integrado de plagas es maximizar el control de plagas con depredadores y parasitoides. Estos se complementan en caso necesario con plaguicidas. Los plaguicidas deben utilizarse de una manera que no afecten a los agentes de control biológico de las plagas. Esto requiere el conocimiento acerca de los productos químicos, los umbrales de pulverización y tiempos de aplicación que son compatibles con los enemigos naturales [4].

El potencial benéfico que alcanza el control biológico utilizando la mejora genética de enemigos naturales de artrópodos fue reconocido por Mally [5] en 1916. El concepto perdió fuerza hasta que DeBach [6] en 1958 y Sailer [7] en 1961 volvieron a discutir sobre el tema, ellos argumentaron que una selección o hibridación podría ser usada para mejorar la eficiencia de enemigos naturales de artrópodos. En 1970 varios laboratorios seleccionaron proyectos para mejorar distintos aspectos biológicos y resistencia a insecticidas [8]. Con respecto a *O. laevigatus* se han realizado algunos estudios frente a los efectos de distintos insecticidas ([9]; [10]; [11]).

El objetivo de este trabajo es estudiar si existe una variabilidad genética entre distintas poblaciones mediterráneas silvestres de *O. laevigatus* en su tolerancia a distintos insecticidas. Como consecuencia de los resultados obtenidos, se realizará la selección de una población con una resistencia mejorada para cada uno de estos plaguicidas.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Recolección y cría de *Orius laevigatus*.

Se recolectaron mediante un aspirador manual un total de 21 poblaciones silvestres de *Orius laevigatus* procedentes de distintos países mediterráneos. Se mezclaron individuos de las distintas poblaciones con la finalidad de obtener una población mezcla con una variabilidad genética diferente. Además como referencia se utilizó una población comercial. Las poblaciones ensayadas en este trabajo fueron: Policoro (Italia), Hellín (Albacete-España), Cuevas de Almanzora (Almería-España), Cabo de Gata (Almería-España), Moreira (Galicia-España), Acate (Italia) y Samaria (Grecia). Previamente fueron estudiadas otras poblaciones, cuyos resultados se han tenido en cuenta al analizar los datos obtenidos en estos últimos ensayos.

Para la cría de las poblaciones recolectadas 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.

Se realizaron bioensayos para individuos de las poblaciones recolectadas con distintos insecticidas que contenían las siguientes materias activas: tiametoxam, imidacloprid e indoxacarb.

Se prepararon distintas dosis de insecticida: 1-30 mg L<sup>-1</sup>, 3-300 mg L<sup>-1</sup>, 10-300 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente para tiametoxam, imidacloprid e indoxacarb. 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 añadirles 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.

Los experimentos se dejaron de 3-7 días dependiendo del insecticida ensayado y transcurrido este tiempo, 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 (CL<sub>50</sub>) y los límites fiduciales (LF) al 95% de confianza. Solamente existieron diferencias significativas, cuando los límites fiduciales se solaparon. Posteriormente se calculó la línea base de susceptibilidad y el factor de susceptibilidad natural, teniendo en cuenta todas las poblaciones ensayadas hasta el momento, aunque no aparezcan en este artículo.

## 3. Resultados y Discusión

Para tiametoxam (tabla 1), no existieron diferencias significativas entre ninguna de las poblaciones. La dosis de campo para el tiametoxam está catalogada como 100 mg L<sup>-1</sup>, por lo que se puede observar que las poblaciones ensayadas son muy sensibles a este neonicotinoide y están muy lejanas a resistir la dosis de aplicación en campo. El factor de susceptibilidad (FS) no fue relevante para ninguna población.

Tiametoxam resultó ser altamente tóxico para todas las poblaciones estudiadas. Estos resultados coinciden con las pruebas realizadas por Van de Veire & Tirry [11], en las que se observaron en el laboratorio los efectos laterales del tiametoxam en una población de *O. laevigatus*. En el estudio se concluyó que el tiametoxam era muy tóxico y persistente. Prabhaker *et al.* [12], también probaron la compatibilidad de tiametoxam e imidacloprid en *O. insidiosus* recolectado en hojas de cítricos y se comprobó que era variablemente susceptible después de 96 horas de exposición.

Al comparar entre líneas base de insecticidas, se observó que el imidacloprid (tabla 2), fue menos tóxico que tiametoxam, aun siendo los dos del grupo de los neonicotinoides. Todas las CL<sub>50</sub> se encuentran por debajo de la dosis de campo (150 mg L<sup>-1</sup>). La población más sensible mostrada en este artículo es Moreira (CL<sub>50</sub>=24,4 mg L<sup>-1</sup>). En la tabla 2, se observan diferencias significativas entre Moreira y la población más resistente, siendo ésta Samaria con una CL<sub>50</sub> de 91 mg L<sup>-1</sup>. El FS destaca en varias poblaciones, siendo casi 12 veces más resistente Samaria que Cabo de Palos (datos no mostrados).

Los resultados de imidacloprid coinciden con otros estudios, en el que este neonicotinoide resulta altamente tóxico para *O. laevigatus*, como es el caso de los ensayos realizados por Angeli *et al.* [10] en los que se observaron los efectos del imidacloprid para *O. laevigatus* en laboratorio y se comprobó fue muy tóxico por

contacto y ligeramente tóxico por ingestión. Estos estudios confirman los realizados por Delbeke *et al.* [4] y Van de Veire *et al.* [13].

Para el indoxacarb (tabla 3), la dosis de campo es 60 mg L<sup>-1</sup> y la población más sensible resultó ser Cabo de Gata (CL<sub>50</sub> = 4,9 mg L<sup>-1</sup>) mientras que la más resistente de las estudiadas en este artículo es Hellín (CL<sub>50</sub> = 25,3 mg L<sup>-1</sup>) y FS de 5,1 (cinco veces más resistente que la población más sensible). Se observan diferencias significativas entre Hellín y Cabo de gata. Al comparar la línea base del indoxacarb (CL<sub>50</sub>=19 mg L<sup>-1</sup>) con las de los neonicotinoides, se observó que fue más tóxico que imidacloprid (CL<sub>50</sub>= 45,3 mg L<sup>-1</sup>) y menos tóxico que tiametoxam (CL<sub>50</sub>=1,9 mg L<sup>-1</sup>). Los resultados de indoxacarb tampoco se aproximaron a la dosis de campo. Este estudio se puede comparar con los ensayos de Angeli *et al.* [10] y con unos ensayos realizados con *O. insidiosus* [14], donde el indoxacarb mostró alta toxicidad en poblaciones criadas en laboratorio.

#### 4. Conclusiones

Se concluyó que tiametoxam resultó ser más tóxico que imidacloprid, e indoxacarb fue más tóxico que imidacloprid y menos que tiametoxam, pero en ninguno de los casos la CL<sub>50</sub> fue superior a la dosis de aplicación en campo. Para un mismo insecticida el efecto es variable dependiendo de la población ensayada pero todos los resultados se encuentran dentro de la normalidad debido a una variabilidad genética dentro de la misma especie.

#### 5. Agradecimientos

Agradecimientos a E. Martínez-Díaz por su inestimable ayuda técnica.

#### 6. Referencias bibliográficas

[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] EPPO. 2009. European and Mediterranean Plant Protection Organization.

[3] Urbaneja A., Arán E., León P., Gallego A. 2003. Efecto combinado de altas temperaturas y de humedades en la supervivencia, fecundidad y fertilidad de *Orius laevigatus* y *Orius albidipennis* (Hem: Anthocoridae). *Bol. San. Veg. Plagas.* 29: 27-34.

[4] Delbeke F., Vercruyse P., Tirry L., De Clerco P., Degheele D. 1997. Toxicity of diflubenzuron, pyriproxyfen, imidacloprid and diafenthiuron to the predatory bug *Orius laevigatus* (HET.: ANTHOCORIDAE). 42: 349-358.

[5] Mally C.W. 1916. On the selection and breeding of desirable strains of beneficial insects. *South African Journal of Science.* 13: 369-385.

[6] DeBach P. 1958. Selective breeding to improve adaptations of parasitic insects. *Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Congress of Entomology.* 4: 759-768.

[7] Sailer R.I. 1961. Possibilities for genetic improvement of beneficial insects. Ralph E. Hodgson, editor. *Germ Plasm Resources American Association of Advancement of Science, Washington, DC;* p. 295.

[8] Hoy M.A. 2006. Perspectives on the development of genetically modified arthropod natural enemies for agricultural pest management programmes. *Perspectives in agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources.* 58.

[9] Biondi A., Desneux N., Siscaro G., Zappala L. 2012. Using organic-certified rather than synthetic pesticides may not be safer for biological control agents: selectivity and side effects of 14 pesticides on the predator *Orius laevigatus*. *Chemosphere.* 87: 803-812.

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

[11] 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. 26:41-50.

[12] 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. 104: 773-781.

[13] Van de Veire M., Sterk G., Van der Staij M., Ramakers P.M.J., 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.

[14] Studebaker G.E., Kring T.J. 2003. Effects of insecticides on *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae) measured by field, greenhouse and Petri dish bioassays. *Florida Entomologist* 86:178-185

**Tablas**

**Tabla 1.** Toxicidad de tiametoxam para 7 poblaciones de *O. laevigatus*.

Población	CL <sub>50</sub> (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	LF (95%) <sup>b</sup>	FS-CL <sub>50</sub> <sup>c</sup>
Policoro	1,0	0,2-1,9	1,0
Hellín	1,6	0,8-2,3	1,6
Moreira	1,6	1-2,2	1,6
Cabo de Gata	1,2	0,5-1,9	1,2
Cuevas de Almanzora	2,6	0,9-5,0	2,7
Samaria	1,1	0,4-1,7	1,1
Acate	1,6	0,8-2,4	1,6
<b>Línea base</b>	1,9	1,5-2,4	

<sup>(a)</sup>CL50=dosis letal media; <sup>(b)</sup>LF=límites fiduciales (P<0,05); <sup>(c)</sup>FS-CL50= Factor de susceptibilidad calculado a partir de la CL50.

**Tabla 2.** Toxicidad de imidacloprid para 7 poblaciones de *O. laevigatus*.

Población	CL <sub>50</sub> (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	LF (95%) <sup>b</sup>	FS-CL <sub>50</sub> <sup>c</sup>
Policoro	77,7	47,8-108,7	10,1
Hellín	77,7	38,2-116	10,1
Moreira	24,4	14,2-36,2	3,2
Cabo de Gata	27,4	16,1-40,6	3,6
Cuevas de Almanzora	62,0	26,6-118,4	8,1
Samaria	91,0	51,3-135,5	11,9
Acate	75,1	53,3-100,1	9,8
<b>Línea base</b>	45,3	34,9-57,3	

<sup>(a)</sup>CL50=dosis letal media; <sup>(b)</sup>LF=límites fiduciales (P<0,05); <sup>(c)</sup>FS-CL50= Factor de susceptibilidad calculado a partir de la CL50.

**Tabla 3.** Toxicidad de indoxacarb para 7 poblaciones de *O. laevigatus*.

Población	CL <sub>50</sub> (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	LF (95%) <sup>b</sup>	FS-CL <sub>50</sub> <sup>c</sup>
Policoro	20,9	7-58,5	4,2
Hellín	25,3	8,5-46	5,1
Moreira	12,0	8,4-15,4	2,4
Cabo de Gata	4,9	1,8-8,2	1,0
Cuevas de Almanzora	19,5	7,3-34,2	3,9
Samaria	11,8	6,3-16,8	2,4
Acate	8,7	3,3-13,7	1,8
<b>Línea base</b>	19,0	13,9-24,3	

<sup>(a)</sup>CL50=dosis letal media; <sup>(b)</sup>LF=límites fiduciales (P<0,05); <sup>(c)</sup>FS-CL50= Factor de susceptibilidad calculado a partir de la CL50.

## El número de goteros por maceta afecta a la distribución de raíces y sales en el sustrato en gerbera

R. Valdés<sup>(1)</sup>, J. Ochoa<sup>(1)</sup>, J.A. Franco<sup>(1)</sup>, M. J. Sánchez-Blanco<sup>(2)</sup>, S. Bañón<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Universidad Politécnica de Cartagena, Departamento de Producción Vegetal, Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena. raquel.valdes@upct.es

<sup>(2)</sup> Departamento de Riego, CEBAS-CSIC. P.O. Box 164. 30100 Espinardo, Murcia.

### RESUMEN

Se realizó un experimento en un umbráculo-invernadero que consistió en regar macetas de gerbera con uno, dos o cuatro goteros ( $1,2 \text{ L h}^{-1}$ ) por maceta bajo dos niveles de salinidad en el agua de riego ( $1,5 \text{ dS m}^{-1}$  y  $3 \text{ dS m}^{-1}$ ). Todas las macetas recibieron el mismo volumen de agua. El objetivo fue conocer cómo el número de goteros por maceta afectaba a la distribución de raíces y sales en el sustrato (100% fibra de coco), considerando cuatro porciones verticales orientadas cardinalmente. El uso de dos o cuatro goteros por maceta redujo el drenaje comparado con el uso de un gotero, lo que indica una mejora de la humedad del sustrato en cantidad y homogeneidad. La presencia de raíces sobre las caras del cepellón fue muy heterogénea, y la salinidad fomentó dicha heterogeneidad mientras que el aumento del número de goteros la redujo. El uso de dos o cuatro goteros por maceta mejoró también la distribución de sales en el sustrato frente a un gotero. En conclusión, recomendamos el uso de dos goteros por maceta porque los efectos de usar dos o cuatro goteros no fueron muy diferentes, mientras que el uso de uno produjo las peores condiciones de humedad y de distribución radicular en el cepellón.

**Palabras clave:** conductividad eléctrica, salinidad, riego, crecimiento radicular, maceta

### 1. Introducción

El riego con agua salina conduce a la acumulación de sales en el sustrato, reduciendo el crecimiento, alterando el desarrollo y produciendo daños foliares [1]. Esto es especialmente relevante en un cultivo en maceta, porque el medio de cultivo está más limitado que en el suelo, y la consecuencia es la pérdida de calidad ornamental y fisiológica de las plantas. La acumulación y distribución de sales en el cepellón dependen de las características físicas del sustrato, especialmente del tamaño de los poros y la densidad aparente. Igualmente, la forma de aplicar el agua de riego en la maceta influye decisivamente [2]. El riego por gotero es un método de riego eficiente porque aporta el agua de forma precisa y reduce la evaporación [3]. Sin embargo, la mejora de la eficiencia del riego por gotero en un cultivo en maceta requieren entender los patrones de distribución de agua y sales en el medio de cultivo, especialmente cuando el riego es salino. De Rijck y Schervens [4] comprobaron que cuando la lana de roca estaba saturada el agua de riego se distribuía horizontalmente, mientras que el flujo de agua y sales tendía hacia el fondo de la maceta

cuando no lo estaba. Entre otros aspectos, la colocación de los goteros en la maceta puede afectar fuertemente a la distribución de la humedad y de las sales en el sustrato [5].

El objetivo fue conocer cómo el uso de distintos números de goteros por maceta afectaba a la distribución de raíces y sales en el cepellón en un cultivo de gerbera, considerando cuatro porciones verticales del cepellón orientados cardinalmente. Eso se evaluó tanto en macetas regadas con agua salina como en macetas regadas con agua no salina.

### 2. Materiales y Métodos

Cultivamos plántulas de gerbera para maceta con flores rosas (Gerbera hybrida cv. Triana) que fueron suministradas por Barberet&Blanc S.A. en cepellones cilíndricos de 33 mm de diámetro. En la primera semana de marzo de 2012 las plántulas se trasplantaron a macetas de PVC de 3,75L (20 cm Ø) con doce orificios de drenaje, que contenían un sustrato 100% fibra de coco (Projar, S.A.). El ensayo se efectuó en un umbráculo-invernadero ubicado en la Estación Experimental Agroalimentaria de la Universidad Politécnica de Cartagena, estudiándose seis

tratamientos que consistían en regar con uno, dos o cuatro goteros bajo dos niveles de salinidad ( $1,5 \text{ dS m}^{-1}$  y  $3 \text{ dS m}^{-1}$ ).

El riego fue controlado automáticamente según lo descrito por [6], usando la sonda EC5 (Decagon Devices, Ltd., Pullman, WA) para determinar el contenido volumétrico de agua ( $\theta$ ) del sustrato. Las sondas fueron conectadas a un CR1000 (Campbell Scientific, Ltd, Logan, UT) programado para la recolección de datos y su monitorización con el software Loggernet 3.4.1. El  $\theta$  del sustrato se obtuvo de las lecturas externas de las sondas (mV) usando nuestra propia calibración del sustrato ( $\theta = 3,664 \cdot \text{mV} - 0,355$ ;  $r^2 = 0,98$ ) calculada según Valdés [7]. El CR1000 decidía el riego cuando el  $\theta$  del sustrato bajaba de  $0,40 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3}$  en el tratamiento control. El volumen aplicado de agua y la frecuencia de riego fueron iguales para los seis tratamientos. Los goteros utilizados fueron de 1,2 L h<sup>-1</sup> (Netafim Ltd. Corporate Headquarters, Tel Aviv, Israel).

En todos los tratamientos se añadieron nitrato amónico, nitrato potásico y fosfato monopotásico, incrementado la CE del agua de riego en  $0,5 \text{ dS m}^{-1}$  con un equilibrio de 80 N-40-80 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> K<sub>2</sub>O (ppm). Para mantener el pH entre 5,5-6 se utilizó HNO<sub>3</sub> al 54%. Para alcanzar la CE de  $3 \text{ dS m}^{-1}$  se utilizó NaCl. Durante todo el experimento se midió el porcentaje de drenaje en cada riego y la CE eléctrica del drenaje (CE<sub>D</sub>). Con estos datos se estimó los gramos de sal en los drenajes, expresándose cómo la relación porcentual entre la sal lavada y la sal aplicada (S<sub>D</sub>). Al final del experimento (13 de septiembre de 2012) se calculó el consumo de agua (agua aplicada), el índice de crecimiento radicular (ICR) y la CE en el sustrato (CE<sub>S</sub>). Para el cálculo del ICR se fotografiaron cuatro caras cardinales del cepellón (sureste [SE], suroeste [SO], noreste [NE] y noroeste [NO]), y mediante un análisis de contraste realizado con el programa Assess 2.0 se determinó el porcentaje de raíces en cada una de las caras. Para la medición de la CE<sub>S</sub>, se congelaron los cepellones para facilitar el corte, y con una sierra se cortaron los cepellones para extraer las cuatro porciones cardinales estudiadas (en las que se ubicaron goteros). La determinación de la CE fue determinada en el extracto de saturación del sustrato [8]. Se utilizaron cuatro cepellones por tratamiento.

Se utilizaron 21 macetas por tratamiento en tres filas de 7 plantas, filas distribuidas al azar en el invernadero. El análisis estadístico fue con un ANOVA bifactorial (Statgraphics Plus 5.1), estudiándose la influencia del número de goteros por maceta y la salinidad del agua de

riego y su interacción. Las medias de los tratamientos fueron separadas con la Prueba de Rango Múltiple de LSD ( $P < 0,05$ ). Los ratios y porcentajes fueron transformados al arcoseno ( $x$ )<sup>1/2</sup> antes del análisis estadístico para asegurar la homogeneidad de la varianza.

### 3. Resultados y Discusión

#### 3.1 Porcentaje y CE del drenaje

Todos los tratamientos recibieron la misma cantidad de agua durante el periodo experimental (50 L/maceta), pero el porcentaje de drenaje fue claramente afectado tanto por la salinidad como por el número de goteros por maceta (NGM) (Tabla 1). Que la salinidad aumentara el drenaje era de esperar, porque la planta creció menos (menos consumo) y porque la salinidad dificultaba la extracción del agua (efecto osmótico). El uso de dos o cuatro goteros por maceta (2GM y 4GM, respectivamente) redujo a la mitad el porcentaje de drenaje comparado con el uso de un gotero por maceta (1GM), pero no hubo diferencias entre 2GM y 4GM. La ausencia de interacción indica que este efecto fue similar en las dos condiciones salinas estudiadas. La disminución del drenaje por 2GM y 4GM indica que ambos tratamientos retuvieron más agua, lo que sugiere una mejor humidificación del sustrato en cantidad y homogeneidad que en 1GM.

Igualmente, la CE<sub>D</sub> fue afectada por los dos factores (Tabla 1). El aumento del NGM produjo un incremento de la CE<sub>D</sub> bajo las dos condiciones salinas estudiadas (Tabla, 2), siendo proporcionalmente mayor bajo  $3 \text{ dS m}^{-1}$  (interacción positiva). Esto condujo a que la eficacia del lavado de sales (ver valores de S<sub>D</sub>) fuera mayor en 2GM y 4GM que en 1GM (Tabla 2), probablemente porque el agua aplicada exploró más volumen de sustrato arrastrando más sales con menos agua.

#### 3.2 CE del sustrato

El riego salino aumentó significativamente la CE<sub>S</sub>, mientras que el efecto del NGM fue en sentido contrario y sólo cuando se regó con  $3 \text{ dS m}^{-1}$  (efecto interactivo). Sin embargo, 2GM y 4GM condujeron a CE<sub>S</sub> similares (Tablas 1 y 2). Este resultado confirma de nuevo que 2GM y 4GM propiciaron un lavado de sales más eficaz que 1GM cuando se regó con cierto nivel de salinidad, probablemente porque la mayor humectación del sustrato favoreció el movimiento horizontal del agua y las sales [4].

### 3.3 Distribución de la CE en las porciones cardinales del sustrato

Cuando regamos con 1,5 dS m<sup>-1</sup> y 1GM, la CE<sub>s</sub> en la porción SE fue menor que en las otras orientaciones (Fig. 1A), porque la ubicación del emisor en dicha orientación formó un bulbo que desplazaba las sales [4,5]. Con 3 dS m<sup>-1</sup> en el agua de riego, este comportamiento se mantuvo (Fig. 1B). El uso de 2GM favoreció la homogenización del contenido de sal entre las cuatro porciones, independiente del nivel de sal; no obstante, se observó que las porciones donde se insertaron los dos emisores (SE y NO) tendieron a acumular menos sales que las otras dos. El riego con 4GM acentuó más el efecto producido por 2GM (Figs. 1A y B).

### 3.4 Presencia de raíces en la cara lateral del cepellón

Tanto la salinidad como el NGM produjeron efectos significativos sobre el ICR (Tabla 1). El primer factor lo redujo, mientras que el segundo lo aumentó (Tabla 2). Sin embargo, al estudiar la interacción vemos que la disminución del ICR por la salinidad no se produjo en 4GM (Tabla 2), indicando que esta disposición de goteros anuló el efecto negativo de la sal sobre el ICR. El aumento del ICR bajo 2GM y 4GM podría estar relacionado con la menor acumulación de sal en estos tratamientos, en geranio se encontró que el número de raíces aumentaba en las zonas del sustrato con menor CE [1]. Sin embargo, en este experimento esto sólo fue cierto con 3 dS m<sup>-1</sup>, porque bajo 1,5 dS m<sup>-1</sup> el uso de 1GM, 2GM y 4GM condujo a similares CE<sub>s</sub>.

### 3.5 Distribución lateral de raíces según orientación cardinal

Cuando se regó con 1GM, la porción SE (donde se insertó el gotero) presentó el mayor ICR de todas las orientaciones del cepellón, mientras que la NO (la más alejada del gotero) registró el ICR más bajo. Este resultado resalta la importancia de la humedad en el sustrato para favorecer el crecimiento radicular, que tiene una influencia directa pero también indirecta al afectar a la concentración de sales y a la temperatura. Esto ocurrió en las dos condiciones salinas estudiadas (Figs. 1C y D). Cuando se regó con 2GM, las porciones SE y NO (las más humedecidas) registraron ICR similares, pero superiores al de las porciones SO y NE (las menos humedecidas). Esto último fue cierto en los dos niveles de salinidad estudiados (Fig. 1C y D). Con 4GM (un gotero en cada orientación) y 1,5 dS m<sup>-1</sup>, el ICR fue mayor en las porciones

orientadas al sur que en las orientadas al norte, lo que podría asociarse con temperaturas más adecuadas en estas porciones (más calor). Cuando se regó con 3 dS m<sup>-1</sup> este comportamiento fue menos evidente, lo que evidencia la interferencia de las sales.

## **4. Conclusiones**

El riego con 2GM o 4GM redujo el drenaje frente a 1GM, mejorando la humectación del sustrato, lo que repercutió en una mejora de la eficacia del lavado de sales. Estos efectos se apreciaron mejor con 3 dS m<sup>-1</sup> que con 1,5 dS m<sup>-1</sup>, lo que indica que la importancia de aumentar el NGM es mayor cuando la salinidad es mayor. La distribución de las raíces entre porciones cardinales del cepellón fue muy heterogénea, mientras que la distribución de sales lo fue menos. El aumento del NGM fomentó una distribución más homogénea de las sales y raíces en el sustrato. Bajo las condiciones de este experimento sugerimos usar 2GM, especialmente bajo riego salino, porque las diferencias agronómicas entre regar con 2GM o 4GM fueron escasas, mientras que las económicas no.

## **5. Agradecimientos**

Agradecemos la ayuda financiera recibida por el Ministerio de Economía y Competitividad y el FEDER, a través de los proyectos (AGL2011-30022-C02-1 y AGL2011-30022-C02-2).

## **6. Referencias bibliográficas**

- [1] Morvant, J.K., J.M. Dole, and E. Allen. 1997. Irrigation systems alter distribution of roots, soluble salts, nitrogen, and pH in the root medium. *HortTechnology* 7:156-160.
- [2] Argo, W.R. and J.A. Biernbaum. 1994. Irrigation requirements, root-medium pH, and nutrient concentrations of easter lilies grown in five peat-based media with and without an evaporation barrier. *J. Amer. Soc. Hort. Sci* 119:1151-1156.
- [3] Wang, R., Y. Kang, S. Wan, W. Hu, S. Liu, and S. Liu. 2011. Salt distribution and the growth of cotton under different drip irrigation regimes in a saline area. *Agr. Water Manage.* 100:58-69.
- [4] De Rijck, G. and E. Schrevels. 1998. Distribution of nutrients and water in rockwool slabs. *Sci.Hort.* 72:277-285.
- [5] Ondrasek, G., D. Romic, M. Romic, F. Tomic, and I. Mustac. 2008. Salt distribution in peat substrate grown with melon (*Cucumis melo* L.). *Acta Hort.* 779: 307-312.

[6] Nemali, K.S. and M.W. van Iersel. 2006. An automated system for controlling drought stress and irrigation in potted plants. *Sci. Hort.* 110:292-297.

[7] Valdés, R., J. Miralles, J. Ochoa, J.A. Franco, M.J. Sánchez-Blanco, and S. Bañón. 2012. Prueba de sondas para medir conductividad y humedad del sustrato en maceta en condiciones salinas. XI Simposio Hispano-Portugués de Relaciones Hídricas en las Plantas. Libro de actas: 222-225.

[8] Camberato, D., R. Lopez, and M. Mickelbart. 2009. pH and electrical conductivity measurements in soilless substrates. *Purdue Univ. Ext. Serv. Bul. HO-237-W:1-6.*

**Tablas y Figuras**

**Tabla 1.** Nivel de significación del ANOVA bifactorial para determinar los efectos de la salinidad, nº de goteros por maceta y su interacción sobre el porcentaje de drenaje (D%), la CE del agua drenada (CE<sub>D</sub>), la sal recogida en el drenaje respecto a la aplicada por el agua de riego (S<sub>D</sub>) la distribución de sal en las secciones cardinales del cepellón (CE<sub>S</sub>) y la presencia de raíces en las caras cardinales del cepellón (ICR)

Factores	D%	CE <sub>D</sub>	S <sub>D</sub>	CE <sub>S</sub>	ICR
Salinidad	***	***	***	***	***
Nº de goteros por maceta	***	*	**	*	**
Salinidad x nº de goteros	ns	**	**	**	**

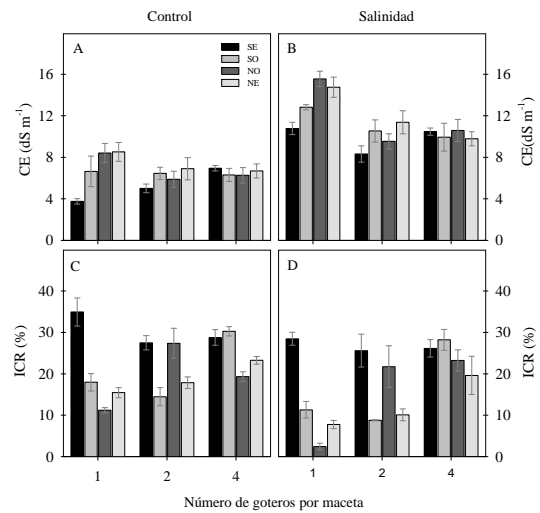
ns, no significativo, \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* p <0,001.

**Tabla 2.** Efectos de la salinidad y el nº de goteros sobre los parámetros estudiados

Salinidad (dS m <sup>-1</sup> )	Nº de goteros por maceta			
	1	2	4	
D%	1,5	15,98b	7,33a	6,52a

	3,0	*26,40b	*13,55a	*12,68a
CE <sub>D</sub> (dS m <sup>-1</sup> )	1,5	2,05a	4,02b	4,95b
	3,0	*5,48a	*12,63b	*13,86b
S <sub>D</sub> (%)	1,5	21,82a	19,64a	21,52a
	3,0	*48,23a	*57,05b	*58,58b
CE <sub>S</sub> (dS m <sup>-1</sup> )	1,5	6,84a	6,06a	6,55a
	3,0	*13,48b	*9,94a	*10,19a
ICR (%)	1,5	19,89a	21,81b	25,42b
	3,0	*12,51a	*16,56b	24,31c

\*indica diferencias significativas entre los dos niveles de salinidad, y diferentes letras indican diferencias significativas entre el número de goteros, según LSD (P <0,05)



**Figura 1.** Distribución de la conductividad eléctrica (CE) y del índice de crecimiento radical (ICR) en el sustrato. CE en la porciones cardinales del sustrato bajo riego con 1,5 dS m<sup>-1</sup> (A); CE en las porciones cardinales del sustrato bajo riego con 3 dS m<sup>-1</sup> (B); ICR en las caras cardinales del cepellón bajo riego con 1,5 dS m<sup>-1</sup> (C); ICR en las caras cardinales del cepellón bajo riego con 3 dS m<sup>-1</sup> (D). Las barras sobre las columnas indican el error estándar (n = 4).



# Consolidación biomecánica de *Ficus macrophylla* monumentales en la reforma de la plaza de San Francisco de Cartagena: Resultados preliminares

M.A. Guillén Pérez,<sup>(1)</sup> J.A. Franco<sup>(2)</sup>, J. Ochoa<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Servicio de Parques y Jardines, Ayuntamiento de Cartagena. guillen@ayto-cartagena.es

<sup>(2)</sup> Departamento de Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena

## RESUMEN

La remodelación de la Plaza de San Francisco, en el casco antiguo de la ciudad de Cartagena (España), ha resultado ser la oportunidad para realizar una experiencia singular, no prevista, en el arbolado monumental (*Ficus macrophylla*) de ese espacio urbano consolidado. Se describen las intervenciones, los condicionantes y las consecuencias inmediatas, destacando las que potenciarán el crecimiento de sus raíces adventicias, convirtiéndolas en pilares complementarios, asegurando así mayor estabilidad de la estructura y longevidad de los ejemplares, evitando podas innecesarias y embelleciendo el entorno resultante de las obras, lo que es un valor añadido en una ciudad con clara vocación turística.

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

## 1. Introducción

Los árboles en las ciudades han sido reconocidos como contribuyentes clave para el entorno urbano de alta calidad. Más allá de los aspectos ambientales y sociales, que por sí mismos ahorran dinero [1], los bosques urbanos y la industria que crece y que los gestiona tienen un impacto positivo en la economía local y estatal [2].

La gestión operativa de los bosques urbanos y árboles influye a largo plazo sobre el desarrollo del verde urbano. Uno de esos aspectos está relacionado con la gestión del riesgo de estos elementos, particularmente cuando alcanzan grandes dimensiones.

El Ayuntamiento de Cartagena cuenta con una historia relativamente reciente en lo relativo a protección y gestión de árboles monumentales [3]. Internacionalmente existe un gran interés por las técnicas de gestión de la peligrosidad como una parte más de la gestión del arbolado, particularmente el arbolado monumental.

La reciente remodelación de la Plaza de San Francisco en Cartagena [4] ha reformado la trama superficial con idea de mostrar la importancia histórica del lugar [5] [6] y rehabilitarlo como espacio público accesible. Esto ha supuesto la desaparición de una buena parte de la vegetación, principalmente arbustos y parterres (sin protección en el PEOPCH [7]), resultantes de la anterior reforma (1984), que

recordaban el original diseño decimonónico modernista [8] como *glorieta*; denominación popular que permanece, retro trayendo a la frondosidad de uno de los pocos jardines de la ciudad amurallada y plaza fuerte.

Conserva además un legado arbóreo, del que, por historia [8], porte y aspecto naturalizado -al salvarse de habituales podas drásticas-, destacan los cuatro ejemplares de *Ficus macrophylla* (1925-1926), incluidos en el único catálogo oficial [9], sin ser estos los más antiguos de la plaza, pues otros bien pudieran proceder de las primeras plantaciones de finales del S.XIX. Existe admiración, pero también cierta preocupación social por las consecuencias de sus dimensiones y por las noticias de accidentes acaecidos por caída de ramas [11], que no deben relacionarse con problemas de mantenimiento.

El género *Ficus* ha sido ampliamente utilizado en jardinería desde finales del siglo XIX y principalmente por su carácter exótico, característico del estilo de la jardinería de la época. Actualmente, éste género se encuentra presente en espacios públicos de todo el arco mediterráneo español, llegando a convertirse en numerosas ciudades desde Barcelona hasta Cádiz en auténticos iconos del paisaje.

El presente trabajo abordó una aproximación a la puesta en marcha de algunas medidas de estabilización de ejemplares monumentales de ficus.

## 2. Material y Método

### 2.1 Características de crecimiento

Estaríamos ante las primeras generaciones de *ficus* que llegan a la madurez en la península, alcanzando 30 m de altura y 25 m de diámetro medidas que, sin ser las de su *hábitat*, son desproporcionadas en comparación con árboles autóctonos. Se trata de ejemplares con crecimiento horizontal marcado que "obliga" a la intervención y al control de dicho crecimiento por un injustificado temor a la inestabilidad de sus ramas horizontales (con mayor callo en el cuello de unión, mejor estructura en la madera de reacción y mayor flexibilidad), alterando el comportamiento de este "árbol de los mil árboles" que necesita esas ramas y su follaje.

Respecto a su enraizamiento, pudiera pensarse que ha de extenderse horizontalmente en el subsuelo. Sin embargo, en este caso no han aparecido secciones importantes en el zanjeado y entibado para reposición de las redes de abastecimiento y saneamiento en viales perimetrales; como tampoco se han mostrado en capas inferiores, o resquebrajando la estructura del refugio antiaéreo de 1936 que permanece bajo el actual pavimento de la plaza y próximo a dos de los ficus, quizás por causa de existencia de agua en el subsuelo en el lugar que hubo una aceña (S.XVII).

La presencia de brotes de hojas sólo en el extremo de madera del año, forma una cúpula verde compacta exterior, favoreciendo un microclima interior, ofreciendo resistencia a los vientos, a cubierto también por edificaciones y colinas.

### 2.2 Inestabilidad de ramas

La inspección visual del arbolado urbano (VTA) es considerada como una herramienta necesaria pero no suficiente para el análisis estructural de ramas de árboles, siendo necesario un conjunto de estudios instrumentales y fitopatológicos complementarios. El intento por prever la ruptura o desplomes de parte del ramaje o del propio árbol en determinados periodos es verdaderamente complejo a pesar de los numerosos métodos y estudios [10], aún no se ha encontrado forma de predicción, como afirman Mattheck y Breloer<sup>1</sup>. Tampoco hay suficientes datos acumulados, salvo informes recientes o anotaciones en el Programa de Órdenes de Trabajo de la Brigada de Jardines

(desde 2004), que deduzcan respuestas de un árbol aparentemente robusto, pero tan sensible a las adversidades como una planta herbácea.

Es sabido, por ejemplo, que las podas excesivas pueden ser origen de pudriciones en los tejidos y oquedades en la madera, paralelamente a una proliferación de nuevas brotaciones en respuesta al corte, produciendo precisamente el efecto contrario al pretendido con la poda: la fácil fractura ante episodios de viento.

Los resultados visibles de los ensayos propuestos desde el Vivero Municipal (1991-1998) sobre ayuda a la orientación de las raíces aéreas, sirvieron de base para proponer enraizamientos que favoreciesen el auto-enraizamiento, colaborando a mejorar la estabilidad y reequilibrar una estructura arbórea poco común en el Levante español, creando pilares naturales de sustentación.

### 2.3. Protección de los árboles

Cumpliendo lo dispuesto en el *Plan General de Ordenación Urbana*, en el arbolado singular sólo intervino el *Servicio de Parques y Jardines*, pudiendo así realizarse intervenciones no previstas en proyecto que permitieron darle valor añadido, superando incertidumbres sobre la dualidad de priorizar o elegir entre el patrimonio arquitectónico o el patrimonio natural de los ejemplares de *Ficus macrophylla*, dos de ellos cercanos a la fachada del edificio *Casa Maestre* obra de Victor Beltrí (1906), catalogado *Bien de Interés Cultural*. El resultado de esa predisposición interdisciplinar fue que pudo compaginarse la imagen de ambos bienes públicos próximos, sin que la poda fuese la solución para ver la fachada. Esa prioridad exigió que, por competir por el espacio y por su fácil arraigo, tres *Ficus nítida* fuesen nuevamente trasplantados (ya lo fueron en 1984). No así las *Livingstonia chinensis* que quedan embutidas bajo la copa de los árboles.

### 2.4 Actuaciones en *Ficus macrophylla*

**Ramas.** Poda selectiva limitada a criterios fitopatológicos y biomecánicos: *Eliminación de ramas secas* de calibre 16/18cm (3000 kg) y codominancias. *Reducción sobrepeso de ramas* (20%-30% de las que conforman la cúpula exterior) y que, por su deformación, aparentaban sobrepeso. *Refaldeo* de ramas en la parte baja. *Acortamiento* de ramas próximas a la fachada de ese edificio en 1,5/2 m. *Aclareo* entre ficus, seleccionando brotes. *Residuos:* Se retiraron más de 6000 Kg de madera, cortes

<sup>1</sup>“...no te fíes solamente de la tecnología, ya que esta sólo puede medir lo que has visto”.

realizados tanto con plataforma elevadora como con equipo de trepa.

**Pilar complementario:** A pesar de los informes de arboristas [12] y de técnico de mantenimiento [13] que justifican el buen estado estructural, como medida preventiva, se propone construir un pilar de recepción (no de sustentación) que no tocaría la rama horizontal más grande, en previsión de un hipotético desplome, pero que reduciría los posibles daños a terceros. El pilar, sección de IPN de acero, con capitel de recepción, irá recubierto de vigas de madera cruzadas, a imitación de los puntales mineros, en consonancia con el entorno.

**Cuello:** Lavado diario de troncos y riego auxiliar, buscando la limpieza de polvo en suspensión y una dotación apropiada para mitigar los efectos negativos del estrés a que estaban siendo sometidos durante el periodo estival.

**Raíces:** Saneamiento con gubia de las raíces superficiales y adventicias dañadas, eliminando zonas necrosadas y corrigiendo desgarros. Aireación superficial de los primeros 15/20 cm de tierra de los “alcorques” resultantes para favorecer la oxigenación de raíces y facilitar la absorción de agua, sin dañar raicillas. Desmante de la primera capa de tierra por contaminación y restos de otras obras. Aporte de materia orgánica de origen vegetal (turba rubia) sobre los ejemplares más afectados por las obras. Humidificación de raíces aéreas, a agua muerta, mojando la estructura mallada que cubre las raíces colgantes. Protección de raíces, mediante enfajado en malla de fibra de coco, sobre estructuras de madera o PVC, o sin estructura. Además de mantener la humedad y acelerar el crecimiento, tienen una función de protección frente a actos vandálicos. Servirán de armadura guía hasta enraizar en suelo o en las perforaciones del nuevo pavimento.

Aplicación de bioestimulantes, de uso habitual en jardinería, a algunas raíces adventicias, con el fin de conseguir un efecto adicional nutriente complementario de estímulo al desarrollo radicular.

**Autoenraizamiento:** En aquellas zonas donde se observe debilidad o posibilidad de nuevos enraizamientos.

**Suelo.** Acolchado en la cubierta terriza de los nuevos parterres (de mayor tamaño), con triturado de raíces de árboles (olivo, almendro y limonero) excepto el pino por su carácter acidificante. Perforación del pavimento y relleno de tierra en zonas donde, una vez anclado cada tutor, poder enraizar nuevos tallos, a fin de

conseguir apoyos que den estabilidad en el futuro.

### 2.5 Control de crecimiento de raíces adventicias

Tomando como “cota 0” la rasante del terreno, se marcaron mensualmente el nivel de la zona apical, tomando datos en las que fue posible realizar enfajado en cada grupo de dos árboles, salvo dos, a más de 5 m, sin terreno donde realizar entutorado, lo que sirvió de testaje. Se supone que el árbol, como en su hábitat original, tiene un comportamiento epífita, sustituyendo aquí las plantas huésped por el entutorado.

## 3. Resultados y Discusión

A la vista de toda la información recopilada y de los diversos informes y evaluaciones realizados desde el Servicio de Parques y Jardines no vemos mayor riesgo del que pueda tener cualquier otro elemento arbóreo urbano. Las únicas actuaciones de poda que se han realizado sobre estos ejemplares han estado orientadas a mejorar la estabilidad biomecánica del arbolado, reduciendo con ello el peso de ramaje y el volumen del árbol. No se han observado patologías destacables que pudieran afectar a la estabilidad de los ejemplares de ficus, lo que refuerza la evaluación del grado de estabilidad de los mismos. Por lo que se refiere al crecimiento radicular, se aprecia un crecimiento de hasta de 1 m en apenas cuatro meses en alguna de las raíces enfajadas hasta la Cota 0.

Antes del ensayo, el crecimiento anual de las raíces aéreas fue inapreciable, salvo excepcionales repuntes (entre 2 y 5 cm), no presentando crecimiento la mayoría. En la *tabla 1*, estas se han marcado con asterisco (\*) las que aparentaban ser yemas latentes que, finalmente, han mostrado algo de crecimiento en grosor, desapareciendo el periodo de latencia que llegaba a ser de 8 a 12 meses.

La sustitución de vegetación bajo los ficus por un acolchado, ha evitado la competencia de las raíces superficiales, mejorando el ambiente para su conservación. Sirve también como medida disuasoria para reducir la presencia de peatones y perros en los parterres.

Los riegos continuos (lavados y de humectación) durante las obras ha incrementado el crecimiento radicular, mejorado el aspecto foliar y la apariencia de buen estado sanitario, en plena sequía.

Las columnas de malla y el acolchado, colaboran en el conjunto del paisaje urbano integrándose

con el arbolado, cuya consecuencia es el desarrollo radicular y su imbricación con el pavimento.

#### 4. Conclusiones

De los trabajos iniciados para mitigar el estrés durante las obras, puede deducirse que los *Ficus macrophylla* han mejorado su estado y aspecto, convirtiéndose en uno de los principales hitos de la plaza. No son una competencia con la arquitectura urbana, sino un complemento de arquitectura vegetal que atrae las miradas de turistas tanto o más que las fachadas.

La modificación de las condiciones ambientales localizadas en las raíces fúlcreas, ahora entutoradas, con menor luminosidad y mayor humedad ambiente en la zona apical (la fibra conserva bien la humedad), ha estimulado el desarrollo radicular contribuyendo considerablemente a la estabilidad de los ficus.

Las podas e intervenciones sobre los ficus han sido incluidas en un Programa Operativo de Gestión de Árboles Monumentales.

Se propone un estudio complementario de la estructura, esfuerzos y cargas que corroboren las previsiones sobre el buen estado de los ficus, sin que ello implique una predicción del comportamiento de una estructura no calculada por el hombre. Conjuntamente, se propone la construcción de un pilar preventivo complementario en la gran rama horizontal, para lo que se realizarán los cálculos oportunos, con un diseño acorde con el entorno creado.

#### 5. Agradecimientos

A Mario Gutiérrez Martínez, podador con certificado europeo de la empresa FCC, S.A. y a su Jefe, Pedro José Cifuentes Rosso, Ingeniero

#### 6. Referencias bibliográficas

[1] Casey, C. 2002 Beyond beautification: environmental benefits of community trees. Wisconsin Urban and Community Forests 10 (2): 1–4.

[2] Kissinger, D. 2002 Beyond beautification: economic benefits of community trees. Wisconsin Urban & Community Forests 10 (3): 5–15.

[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*.

[4] López, J., Pérez, V. 2012, Proyecto de reforma de la Plaza de San Francisco. Ayto. Cartagena.

[5] Ruiz, E. 2013 *Cartago Nova Guía Didáctica*. Fundación Teatro Romano de Cartagena. Pg.18-19

[6] RD 3046/1980, de 12/12, BOE 28 de 02/02/1981 Declaración de Conjunto Histórico Artístico al Casco Antiguo de Cartagena

[7] BORM 183 de 09/08/2006 Plan Especial de Protección del Conjunto Histórico de Cartagena

[8] Mancha, C. 1874. Arquitecto. Proyecto de Glorieta ajardinada Plaza Valarino Togoeres. Archivo Municipal.

[9] Ferrándiz, C. 1990. Real Jardín Botánico de Cartagena. Academia Alfonso X El Sabio.

[10] Sterken, P. 2005. Manual para en análisis de la estabilidad del arbolado mediterráneo.

[11] Diario La Verdad, 2000. Caída de rama en Plaza de Santo Domingo (Murcia) y 03/05/2014 Caída de ramas en Jardín de Floridablanca (Murcia).

[12] Puerta, J. 2013. Informe técnico sobre los ficus ejemplares de la plaza San Francisco de la ciudad de Cartagena.

[13] Cifuentes, P.J. 2014. Informe técnico sobre los ficus ejemplares de la plaza de San Francisco de Cartagena.



**Figura 1** Localización de raíces adventicias Técnico Agrícola, por su tiempo, desinteresada colaboración, dedicación y recopilación de datos.

**Tabla 1.** Control de medidas de raíces

TEST DE CONTROL DE RAÍCES ADVENTICIAS en <i>Ficus macrophylla</i> EN LA PLAZA DE SAN FRANCISCO										
GRUPO	RAÍZ	COTA 0	COTA 1	COTA 2	COTA 3	COTA 4	COTA 5	COTA 6	CRECIMIENTO TOTAL (cm)	
		FECHA								
		30/07/2013	16/08/2013	19/09/2013	17/10/2013	19/11/2013	17/02/2014	21/04/2014		
Ficus NORTE	A	-	20	26	30	18	5	5	104	
	B	-	25	21	14	17	3	3	83	
	C	-	30	8	Ha tocado suelo					38
	D	-	10 a 15	16	15	0 (si interior)	0*	0*	45	
	E	-	10 a 12	20	0	0	0*	0*	32	
	F	-	3 a 5	Ha tocado suelo					5	
	G	-	10 a 15	4	10	Nuevo instalado	10	10	45	
	H	-	No instalada		Nueva instalación		3	3	6	
Ficus OESTE	A	-	10	15	25	24	5	3	57	
	B	-	10	15	20	0 (sin interior)	5	5	58	
	C	-	10	25	28	20	8	5	109	
	D	-	15	36	Ha tocado suelo					78
	E	-	13	22	Alterada	Alterada	10	10	55 (sin suelo)	
	F	-	30	17	0	14	10	10	84	
	G	-	No presenta	No presenta	5	5	0*	0*	10	
	H	-	No instalada	No instalada	No instalada	Nueva instalación	3	3	6	

# IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA E INTERÉS EN AGRONOMÍA EN EXUDADOS RADICULARES

R. Pérez-Santamarina<sup>(1)</sup>, A. Gómez-Cadenas<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203, Cartagena, España  
ricardopsf@hotmail.com

<sup>(2)</sup> Universitat Jaume I, Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural, Campus Riu Sec, Castellón, 12071, España.

## RESUMEN

El objetivo de este proyecto es generar una colección de compuestos naturales con actividad biológica procedentes de exudados radiculares de plantas cultivadas *in vitro*. Para alcanzar dicho objetivo se han optimizado los protocolos de cultivo *in vitro* para *Nicotiana tabacum*, susceptible de producir una gran variedad de compuestos bioactivos en sus exudados radiculares. Se evaluó la capacidad de diferentes elicitors químicos (nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>), metil-jasmonato y el ácido salicílico) adicionados al medio de cultivo para modificar la producción de exudados radiculares, tanto en cantidad como en composición química y se midió, para cada tratamiento (elicitor y concentraciones ensayadas), la actividad antioxidante, el perfil metabolómico y el efecto que tienen sobre el crecimiento de diferentes hongos fitopatógenos los exudados radiculares. A la vista de los resultados se descarta la utilización del (AgNO<sub>3</sub>) como elicitor químico, dejando como elicitors el MeJA y el SA, ya que éstos inducen la producción de una gran cantidad de compuestos exudados al medio y estimulan la acumulación de compuestos que ya se exudaban de forma basal. Posteriormente se lleva a cabo un fraccionamiento de los exudados en tres fracciones diferentes atendiendo a la polaridad de los compuestos que las constituyen, realizando un análisis espectrométrico para determinar el compuesto químico responsable de la actividad biológica, la cual se evaluará utilizando distintos modelos vegetales *in vivo* e *in vitro*. El objetivo de este trabajo es determinar las fracciones donde queda retenida la actividad biológica.

**Palabras clave:** *in vitro*; bioactivo; elicitors; fracción.

## 1. Introducción

Tras haber establecido un protocolo eficiente para el fraccionamiento químico de las diferentes muestras biológicas en tres fracciones diferentes, atendiendo a la polaridad de los compuestos que las constituyen. Los estudios encaminados a estudiar el efecto de las diferentes fracciones sobre el crecimiento del hongo *P. citrophthora* pusieron de manifiesto que la actividad antifúngica presente en los exudados radiculares de plantas de *N. tabacum* cultivadas *in vitro*, queda retenida en la fracción 1. De igual forma, los resultados obtenidos al estudiar la capacidad antioxidante nos permiten concluir que dicha actividad está presente únicamente en la fracción 1, que se corresponde con los compuestos más polares. No se detectó actividad antifúngica ni antioxidante en las fracciones 2 ni 3.

En este trabajo se ha llevado a cabo un subfraccionamiento de la fracción 1 obtenida de

las muestras de exudados radiculares, donde quedaba retenida la actividad biológica de los mismos (tanto antifúngica como antioxidante). Se ha llevado a cabo el análisis espectrométrico de cada una de las subfracciones para su caracterización química, así como la evaluación de su actividad biológica utilizando distintos modelos vegetales *in vitro*.

## 2. Materiales y Métodos

Para conseguir la separación de los compuestos presentes en la fracción 1, el fraccionamiento se llevó a cabo a pH 8. Se utilizaron columnas de carbono C18. Estas columnas retienen en su matriz aquellos compuestos apolares presentes en la muestra. Estos compuestos son liberados posteriormente al inyectar (MeOH) en la columna.

Para conseguir un adecuado fraccionamiento atendiendo a la hidrofobicidad de los compuestos a pH 8, de forma que queden

retenidos en la columna los compuestos orgánicos de carácter básico presentes en las muestras, se ha seguido el siguiente protocolo:

**Paso 1:** Acondicionamiento de la columna. Se hace pasar a través de la columna 1 ml de H<sub>2</sub>O seguido de 1 ml de MeOH.

**Paso 2:** Se lleva la muestra a pH 8 (100 ml de Fracción 1) y se hace pasar todo el volumen a través de la columna. Se recoge el volumen que eluye, que corresponde a la Fracción 1.1.

**Paso 3:** A continuación se hace pasar 5 ml de MeOH al 50% en agua, obteniendo la Fracción 1.2, menos polar que la Fracción 1.1.

**Paso 4:** Finalmente se pasan 5 ml de MeOH al 100%, lo que permite recuperar la Fracción 1.3, que es la constituida por compuestos menos polares.

Una vez realizado el fraccionamiento de las muestras se obtiene, para cada una de ellas, las fracciones 1.1, 1.2 y 1.3, que constituirán el material de partida para llevar a cabo los ensayos de actividad biológica pertinentes.

## 2.1 Análisis cromatográfico

En el estudio se utilizaron tres replicas biológicas de las fracciones de exudados a analizar: **Fracción 1:** eluato de agua a pH=3 (**F1**); **Fracción 1.1:** eluato de agua a pH=8 (**F1.1**); **Fracción 1.2:** eluato de metanol:agua 50:50 (**F1.2**), y **Fracción 1.3:** eluato de metanol (**F1.3**).

Tras el análisis cromatográfico y el tratamiento estadístico de la información (captura de picos, alineamiento...) se llevó a cabo el análisis de componentes principales con el software "ginkgo", fig.1.

## 3. Resultados y Discusión

El análisis de componentes principales agrupa de forma inequívoca los valores correspondientes a las muestras correspondientes a Exudados-Fracción 1 (EXF1) y a Exudados-Fracción 1.1 (EXF11) separadas entre ellas, y muy diferenciadas del resto de fracciones y de las muestras sin exudados (blancos). En el centro de la gráfica de loadings se encuentran agrupados los blancos de las fases de elución y las fases de exudados correspondientes a las Fracciones 1.2 y 1.3 (EX12 y EX13), siendo, difíciles de discriminar puesto que no existen diferencias relevantes entre ellos. Los valores correspondientes a las muestras obtenidas del fraccionamiento de la Fase 1 de los exudados muestran una variabilidad importante, lo cual es coherente con los resultados obtenidos en los ensayos de

actividad biológica que se describen en los apartados siguientes.

Con el fin de comprobar si los valores correspondientes al fraccionamiento de las muestras de exudados se diferenciaban correctamente se ha filtrado la variabilidad correspondiente a los blancos. Como se observa en la Figura 2, todas las fracciones se distinguen perfectamente entre ellas, siendo la reproducibilidad entre replicas biológicas bastante alta. La representación gráfica muestra también que los valores correspondientes a las fracciones 1 y 1.1 están claramente diferenciados de las 1.2 y 1.3.

Se ha ensayado la actividad de las muestras obtenidas del subfraccionamiento de la fracción 1 obtenida de exudados radiculares de plantas de *Nicotiana tabacum* cultivadas *in vitro* después de la elicitación con ácido salicílico (SA), sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos *Phytophthora citrophthora* y *Alternaria alternata*.

Se han llevado a cabo diferentes ensayos con el fin de determinar si la actividad responsable de reprimir el crecimiento fúngico reside, de forma mayoritaria, en alguna de las subfracciones obtenidas.

Los resultados fueron evidentes desde los 7 días de iniciado el cultivo. El ketoconazol mostró un claro efecto fungicida para ambas cepas fúngicas (Figura 3). La fase 1 obtenida del fraccionamiento de los exudados radiculares de plantas de *N. tabacum* cultivadas *in vitro* y elicitadas con 100 µM SA tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento del hongo *P. citrophthora*. Dicha acción antifúngica se reparte entre las 3 subfracciones (1.1, 1.2 y 1.3). Aunque las tres subfracciones tienen una actividad antifúngica menor que la fracción 1, es la subfracción 1.2 la que parece retener un mayor efecto sobre el desarrollo del hongo (Figura 4). En el caso del hongo fitopatógeno *A. alternata* los resultados de experimentos anteriores (ver informe previo) pusieron de manifiesto que la fracción 1, obtenida del fraccionamiento de los exudados radiculares de plantas de *N. tabacum* cultivadas *in vitro* y elicitadas con 100 µM SA tenía un efecto antifúngico. Al llevar a cabo un nuevo fraccionamiento de esta fracción 1, no se observan diferencias significativas entre la capacidad antifúngica de ésta y de las subfracciones 1.1, 1.2 y 1.3 (Figura 5). Posteriormente se ensayó la actividad antioxidante de diferentes muestras procedentes del fraccionamiento químico, en función de su polaridad.

En la figura 6 se muestran los resultados obtenidos en un ensayo en el que se midió la actividad antioxidante en las muestras de exudados procedentes de plantas cultivadas *in vitro*, y sometidos o no a un tratamiento de elicitación química con SA 100  $\mu$ M. En relación a su capacidad antioxidante, las muestras pueden agruparse en dos bloques, el primero engloba las diferentes fracciones de las muestras del agente elicitor SA, las correspondientes a los controles (fraccionamiento de H<sub>2</sub>O) y las subfracciones F1.2 y F1.3. Todas estas muestras carecen de actividad antioxidante. En un segundo bloque se agrupan las muestras correspondientes a la fracción 1, fracción 1.1 de exudados de plantas elicidadas con SA y fracción 1.1 procedente de exudados de plantas sin elicitar, lo que pone de relieve que la actividad antioxidante presente en la fase 1, al realizar un nuevo fraccionamiento de ésta queda retenida en la fase 1.1.

#### 4. Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos en el estudio de la actividad biológica, se llevó a cabo un nuevo fraccionamiento de esta fase. A diferencia del primer fraccionamiento, que se llevó a cabo a pH 3, el subfraccionamiento de la fase 1 tuvo lugar a pH 8. El análisis de componentes principales de los datos obtenidos en los cromatogramas, una vez procesados matemáticamente, muestra que están mucho más próximas las fracciones 1 y la 1.1, y que éstas se separan de la 1.2 y 1.3. Estos datos concuerdan con los obtenidos en el análisis de la actividad antioxidante. La capacidad antioxidante que, después del primer fraccionamiento quedaba restringida a la fase 1 (más polar a pH 3), se manifiesta, tras el segundo fraccionamiento a pH 8, únicamente en la subfracción 1.1, no detectándose actividad antioxidante en las fracciones 1.2 ni 1.3.

Los resultados obtenidos al estudiar el efecto de las diferentes subfracciones sobre el crecimiento de dos cepas de hongos fitopatógenos fueron muy diferentes. En el caso de *Phytophthora citrophthora* la adición de la fracción 1.1 al medio PDA permitió un desarrollo del hongo muy similar al observado en los controles, no observándose el efecto antifúngico de la fracción 1. Por el contrario, en el caso del hongo *Alternaria alternata* no se observaron diferencias significativas entre la capacidad antifúngica de las fracciones 1 y 1.1. Puesto que la subfracción 1.1 mantiene la capacidad antioxidante de la fracción 1 y su efecto sobre el crecimiento de diferentes cepas

de hongos depende de la especie fúngica, será de gran interés conocer cuál es el efecto de esta fracción sobre el desarrollo de hongos beneficiosos para el desarrollo de las plantas.

#### 5. Agradecimientos

A la empresa A. Codiagro S.C.V.L. la financiación de este proyecto.

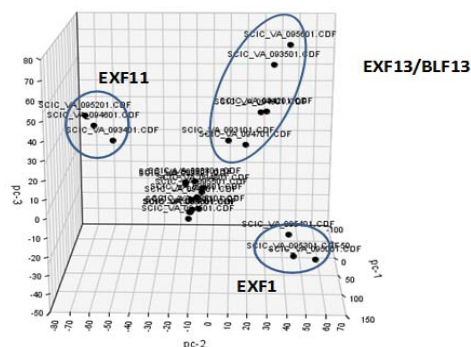
Dr. Aurelio Gómez Cadenas por su inestimable participación en este trabajo.

Al departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural de la universidad Jaume I.

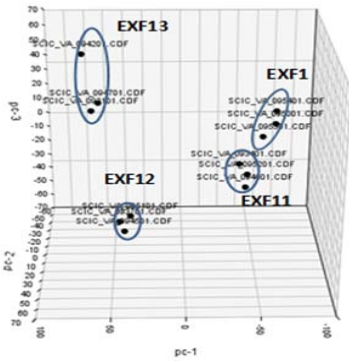
#### 6. Referencias bibliográficas

- [1] Gagnon H, Ibrahim RK. (1997) Effects of various elicitors on the accumulation and secretion of isoflavonoids in white lupin. *Phytochemistry* 44: 1463-1467.
- [2] Kim OT, Kim MY, Hong-MH, Ahn JC, Hwang B. (2004) Stimulation of asiaticoside accumulation in the whole plant cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban by elicitors. *Plant Cell Rep* 23: 339-344.
- [3] Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G. (2006) processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal Chem.* 78: 779-87.
- [4] Gómez-Cadenas A, Pozo O, García P, Sancho J.V (2002). Direct analysis of abscisic acid in crude plant extracts by capillary liquid chromatography/electrospray-tandem mass spectrometry. *Phytochemical Analysis* 13, 228-234.

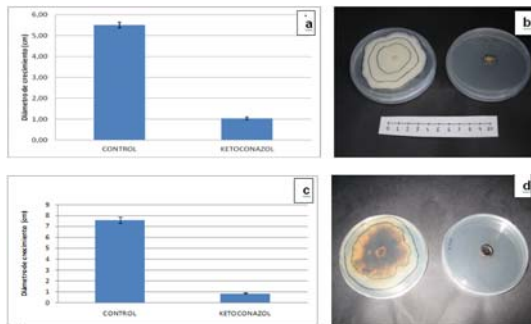
#### Figuras



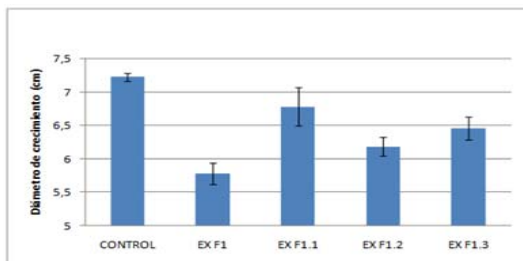
**Figura 1.** Representación de los picos cromatográficos tras el análisis de componentes principales.



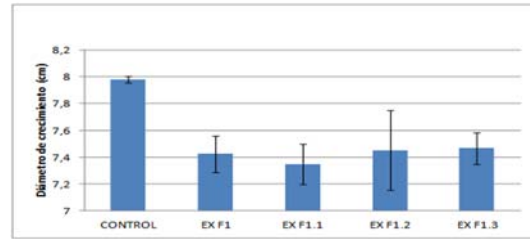
**Figura 2.** Representación de los picos cromatográficos tras el análisis de componentes principales una vez filtrados los valores correspondientes a los blancos.



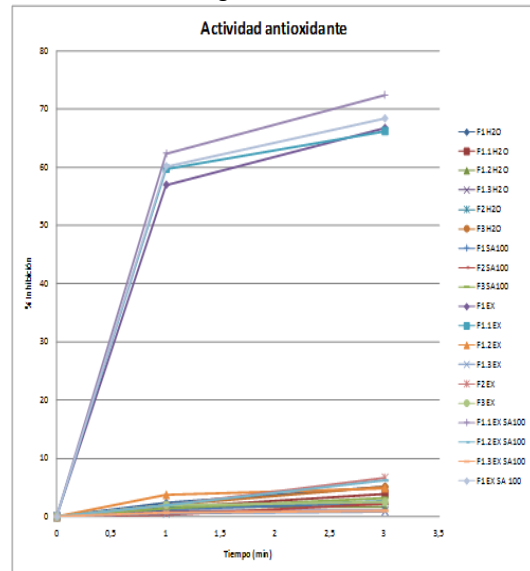
**Figura 3.** Efecto del fungicida ketoconazol sobre el crecimiento de *Phytophthora citrophthora* (a,b) y *Alternaria alternata* (c,d) después de 7 días en cultivo. a,c: diámetro del halo de crecimiento, b,d: imagen del cultivo.



**Figura 4.** Efecto de las diferentes fracciones obtenidas de exudados radiculares de plantas de *N. tabacum* elicitados con  $100 \mu\text{M}$  SA sobre el crecimiento del hongo *P. citrophthora*.



**Figura 5.** Efecto de las diferentes fracciones obtenidas de exudados radiculares de plantas de *N. tabacum* elicitados con  $100 \mu\text{M}$  SA sobre el crecimiento del hongo *A. alternata*.



**Figura 6.** Actividad antioxidante (determinada como el porcentaje de descenso de la absorbancia a 1 y 3 minutos con respecto de la medida a tiempo 0). Las muestras denominadas FX H2O corresponden a agua milli-Q fraccionada. Las muestras denominadas FX SA100 corresponden a agua milli-Q con SA  $100 \mu\text{M}$ , sin planta, fraccionada. Las muestras denominadas FX EX corresponden a exudados sin elicitar fraccionados. Las muestras denominadas FX EX SA 100 son exudados elicitados con SA  $100 \mu\text{M}$  fraccionados (FX corresponde a las fracciones F1, F2 y F3 del primer fraccionamiento).



## Villas y Casas del Campo de Cartagena

M. Ortega, J.I. Manteca, J. Calvo

Universidad Politécnica de Cartagena, Campus Alfonso XIII, Paseo Alfonso XIII, 50, C.P.30203, Cartagena, España. matilde.ortega@upct.es

### RESUMEN

La vivienda rural del campo de Cartagena de principios del siglo XX fue construida en gran parte por ricos mineros que explotaban las minas de la Unión. Estos caciques buscaban invertir en terrenos rurales para diversificar sus negocios mineros y dedicarse también a la agricultura. Por otro lado, también pretendían encontrar un remanso de paz en el campo donde cultivar árboles y delicados jardines. Muchas de estas construcciones se encuentran influidas por el modernismo imperante en Europa aunque con características singulares, pues poseen detalles adaptados a la arquitectura rural mediterránea. En estas construcciones encontramos una vuelta a los clásicos con *revivals*, tanto clasicistas, imitando a los que se seguían en la tradicional villa italiana, como neo-islámicos o neo-mudéjares. En muchas de las casas que se encuentran repartidas en el campo encontramos elementos tales como las torres, que provienen de la tradición amurallada medieval o las logias de la tradición clasicista italiana. Estas construcciones se encuentran diseminadas por muchos puntos del campo de Cartagena, siendo mayor su presencia en poblaciones como La Aljorra, Pozo Estrecho, los Dolores o la Palma.

**Palabras clave:** clasicismo; torre; modernismo;

### 1. Introducción

Esta exposición versa sobre un capítulo que se incluye dentro de la tesis doctoral: Criterios para la recuperación y puesta en valor del patrimonio minero. El caso de la Sierra Minera de Cartagena-La Unión.

La tesis doctoral en cuestión versa sobre el estudio de los muchos de los restos que han quedado en la sierra minera y las poblaciones limítrofes tras muchos años dedicados a la explotación minera. Muchos estos elementos son castilletes, lavaderos, pozos,...etc., pero una parte importante de la tesis se centra en el estudio de las viviendas de los mineros. Existen distintos tipos de vivienda, desde la más sencilla del minero más humilde, que vivía en una cueva junto a la mina, a las refinadas mansiones de los patronos caciques.

El presente escrito se centra en el estudio de algunas de las villas y casas, que se extienden por el campo de Cartagena y que fueron en su mayoría construcciones de ricos mineros, que tras poseer su casa principal en la Unión o Cartagena, decidieron invertir en terrenos para la explotación agraria con el fin de poseer también una casa de recreo en el campo. Diversos autores han comprobado como la pujanza económica de principios del siglo XX,

motivada por la minería, trajo consigo también un crecimiento de la producción agraria. [1]

La mayoría de las viviendas de campo construidas poseían un gran valor estético, ya que fueron edificadas por muchos de los arquitectos en boga de la época que realizaban las refinadas viviendas de la ciudad. La gran extensión de los terrenos de las casas de campo permitía a sus propietarios dedicar su tiempo al cuidado de jardines, a veces exóticos, y de árboles frutales. Estas ocupaciones no podían realizarse en las casas de menor tamaño de la ciudad, la cual se estaba quedando sin terreno donde construir. Muchas de las viviendas seguían un estilo ecléctico imperante en muchas de las construcciones de la época. [2]

Los objetivos de esta comunicación se centran en encontrar características arquitectónicas comunes a las viviendas rurales que se estudian y que se encuentran diseminadas por el campo de Cartagena.

### 2. Materiales y Métodos

Tras estudiar fotográficamente muchas de las viviendas que se encuentran en el campo de Cartagena, se buscarán las características arquitectónicas comunes a la mayoría de ellas.

Se considera necesario realizar una pequeña introducción histórica del concepto de vivienda desde los primeros tiempos.

La vivienda como tal surge como una necesidad vital del ser humano con el fin de protegerse de las inclemencias del tiempo y del ataque de las fieras. Se tiene conocimiento de que los neandertales usaron las cuevas como refugio en etapa sedentarias y que utilizaron excavaciones semienterradas tapadas con ramas u hojas en etapas más nómadas. La tienda de tela fue otra de los medios de protección de las primeras civilizaciones.

Cuando el hombre empezó a utilizar las herramientas fue capaz de fabricar y excavar sus propias viviendas. Se sabe que la evolución de la vivienda desde las primeras semienterradas a las realizadas sobre superficie con adobe se debe a la civilización mesopotámica que luchó contra las inclemencias del tiempo con viviendas realizadas con esta técnica al igual que usaran los egipcios. El uso de la tierra permitía realizar muros de gran espesor que permitían que la vivienda se cerrara al exterior y volcara a un patio interior con el fin de protegerse del calor. Esta distribución de vivienda también fue utilizada por los romanos en sus domus y más tarde en sus villae.

El concepto de villa italiana proviene de las villae romanas. En la civilización romana existían dos tipos de villa. Si se situaban en el extrarradio de las ciudades se denominaban villae suburbanae y eran residencias lujosas y destinadas al ocio. Si se situaban en el campo se llamaban villae rusticae y se dedicaban a la agricultura y la ganadería. Muchas de las villae rusticae llegaron a ser grandes aldeas, sobre todo al final del imperio romano en el que se crearon grandes latifundios. Algunas de estas viviendas pertenecían a patricios y en ellas estaban claramente diferenciadas tres partes, la pars dominica o urbana, donde residía el dueño y que a veces poseía una gran decoración, la pars rusticae donde residían los trabajadores, y la pars frutuaria en la cual se encontraba la parte destinada a las labores de agricultura.

Todas estas partes, a veces, se encontraban alrededor de un gran patio central.

Ya en el siglo XVI en Italia se crea un concepto nuevo de pequeña vivienda señorial situada en el campo llamada villa, similar a la villae romana, y que se dedica tanto al ocio como a la explotación agrícola. Estas construcciones intentaron imitar la proporción y equilibrio que poseían los palacios de las ciudades. Las villas se caracterizaron por tener una zona de estancia

para los propietarios y unas construcciones anexas para el servicio llamadas barchesse. Las construcciones se realizaron siempre respetando el paisaje, las vistas y la mejor orientación. Estas viviendas buscaban la proporción y la simetría dentro del clasicismo que caracterizaba la arquitectura renacentista. La mayoría poseían fachadas normalmente decoradas con frontones situados sobre logias. Las llamadas logias son pórticos huecos sujetados por columnas en los que a veces se incluyen símbolos del propietario. Muchas de estas villas situaban en planta baja las cocinas y zonas de uso y en la planta superior las viviendas y salones. Los salones se solían situar en el eje central, y a los lados de éstos se encontraban las habitaciones. Estas viviendas provienen de la antigua edificación fortificada medieval o castillo encontrando en algunas de ellas un patio cerrado protegido por un muro. En ese patio se situaban los hornos, gallineros y demás construcciones de los sirvientes. Algunas villas poseían incluso una torre, similar a los castillos medievales, ya que la necesidad de defensa a veces era ineludible.

El máximo exponente de este movimiento es Andrea Palladio, arquitecto que construyó un gran número de villas situadas en la región del Véneto. Uno de los ejemplos más conocidos es la Villa Capra, más conocida como villa Rotonda.

En otros lugares del mundo, como en Inglaterra, también se siguió el palladianismo en el siglo XVII, un ejemplo claro es la obra del arquitecto Christopher Wren. Este estilo también se encuentra en otros lugares, como en Norteamérica en algunos edificios de Thomas Jefferson.

Si se analizan las viviendas de campo construidas a principios del siglo XX situadas en el campo de Cartagena, encontramos esta tipología de vivienda en algunas de ellas, aunque aquí el concepto de villa no se seguirá estrictamente. Algunas viviendas sí tendrán elementos arquitectónicos clásicos que se aprecian en detalles como columnas toscanas, logias, frontones,... pero la mayor característica será la integración en el paisaje y las vistas. Por tanto, aunque muchas de las viviendas que encontramos se conocen comúnmente como villas, podrían la mayoría incluirse dentro de casas de campo.

Uno de los ejemplos más italianizantes será la villa Calamari o Villa Versalles situada en San Félix. Esta vivienda perteneció a un minero inglés muy aficionado a la botánica. Posteriormente pasó a manos del minero italiano Calamari y más tarde al minero Celdrán.

La construcción posee influencias cantábricas o de la Riviera italiana en las galerías de madera, además de claras influencias clasicistas, ya que posee un porche de columnas toscanas con arcos rebajados. Llama la atención el delicado tratamiento de los jardines y la existencia de un patio al que vuelcan las viviendas de los sirvientes tal y como ocurría en las villas clásicas.

El jardín presenta distintos espacios de relax como un cenador o una fuente. **Figura 1.**

En Los Dolores se encuentra otra vivienda llamada Huerto de las Bolas o Torre Llagostera donde también se localiza un importante jardín. El elemento más característico de esta vivienda es una torre acabada con trencadís al estilo modernista gaudiano. Se cuenta que desde esa torre se comunicaba el propietario con otra vivienda que poseía en Cartagena por medio de banderas. Esta vivienda además, posee influencias exóticas y victorianas pues cuenta con un porche con marquesinas de columnas de fundición. **Figura 2.**

El uso de la torre se encuentra muy presente en muchas de las casas del campo de Cartagena como una reminiscencia de la torre defensiva medieval. Se puede localizar también en algunas otras construcciones, como en la Torre Calín o la Torre Asunción, ambas situadas en la Aljorra. **Figuras 3 y 4.**

La primera de ellas posee detalles modernistas de estilo árabe, mientras que la segunda posee una gran cantidad de construcciones, entre las que destacan una iglesia y viviendas con detalles eclecticismos, que pudieron ser realizadas por el arquitecto Tomás Rico. Muchas otras construcciones del campo de Cartagena poseen también varias edificaciones, en Pozo Estrecho encontramos La Finca la Rosa, que se caracteriza por tener varias construcciones decoradas con palmetas y roleos además de una torre, y la Finca Torre Nueva, que fue realizada por Pedro Bernabé, y que posee gran cantidad de construcciones, como una iglesia con detalles eclecticismos y varias construcciones con detalles islámicos tales como arcos polilobulados. **Figura 5.**

Detalles modernistas islámicos neo-mudéjares también se encuentran en la Finca Lo Treviño en la Palma, que fue propiedad de la familia Dorda. Esta finca cuenta con un porche con celosía de madera realizada con arcos de herradura.

En la Finca Pérez Espejo de la Aparecida también se encuentran arcos de ese tipo junto con detalles en trencadís. **Figura 6.**

En la Finca del Inglés de Perín, de los arquitectos Tomás Rico y Francisco de Paula, se pueden observar detalles modernistas que imitan la piedra las formas gaudianas.

En otras construcciones como Villa Pilar en el Albuñón se localizan varios edificios entre los que destaca la torre a cuatro aguas de cubierta plana con buhardilla de la casa principal. **Figura 7.**

Esta tipología también se puede ver en viviendas tales como Torre Antoñita o la finca llamada de la Piqueta Nueva ambas en la Palma.

Existen otras muchas viviendas entre las que se encuentra la Villa Carmen en Pozo Estrecho, Villa María, realizada por Carlos Mancha y de estilo ecléctico, el Molinar en la Carretera de la Palma con jardín delantero y fachada realizada con un falso almohadillado, o la Finca la Flora con gran cantidad de construcciones entre las que destaca la torre, que nos muestran la gran diversidad de estilos que se extienden por todo el campo de Cartagena. **Figura 8.**

### 3. Resultados y Discusión.

Tras una un estudio de las distintas viviendas existentes se puede apreciar que las viviendas del campo de Cartagena no se pueden clasificar dentro de un solo estilo. En ellas se encuentran estilos eclécticos desde un modernismo neo-mudéjar a un clasicismo italianizante similar a las villas. Dentro de una misma finca pueden existir diferentes construcciones realizadas en un estilo distinto, por distintos arquitectos y en distintos periodos de tiempo, adaptándose a las necesidades del propietario. Muchas de las fincas poseen varias construcciones unas más señoriales para el propietario, y otras de menor calidad para los trabajadores. Existen gran cantidad de construcciones desde iglesias a torres vigía que se adaptan a las necesidades del dueño de la finca. En muchas de ellas los jardines se incluían como una parte muy importante de la casa, encontrándose en algunos de ellos arquitecturas muy interesantes como cenadores o palomares. Asimismo, mucha de la vegetación que existía en ellas era exótica y refinada, con el fin de satisfacer las necesidades lúdicas de afición a la jardinería de muchos de los propietarios.

### 4. Conclusiones

Se puede concluir que la influencia modernista de las viviendas de ciudad se trasladó a las construcciones rurales tal y como se ha apreciado en las distintas construcciones estudiadas. Estas viviendas tienen tanto interés arquitectónico como otras muchas viviendas modernistas de ciudad a las que sí se ha

ayudado para mejorar su estado. Muchas de las casas de campo que se han visitado se encuentran en un estado prácticamente ruinoso, ya que sus propietarios no poseen los recursos necesarios para su mantenimiento. Afortunadamente algunas sí se encuentran en buen estado, gracias a intervenciones de capital privado o público. Intervenciones en las que se han llevado a cabo reconversiones hacia espacios productivos, como hoteles o restaurantes. Sería muy deseable que se realizaran más esfuerzos para mantener el patrimonio que posee el campo de Cartagena, siguiendo ejemplos de correcta realización como El Huerto de las Bolas, y no dar lugar a situaciones tan deplorables como el estado actual de villa Calamari, en la que el abandono está llevando a la total destrucción de un rico patrimonio por medio de incendios y expolios. Está en manos de todos luchar por la conservación.

### 5. Agradecimientos

La mayoría del estudio que se ha hecho con respecto a la vivienda rural del campo de Cartagena se ha realizado en base al previamente llevado a cabo por parte del profesor Francisco Javier Pérez Rojas en su tesis doctoral Cartagena, 1.874-1.936 (transformación urbana y arquitectura), siendo su ayuda vital para el desarrollo de mi actual tesis.

### 6. Referencias bibliográficas

[1] Pérez Rojas J. 1986. Cartagena, 1.874-1.936 (transformación urbana y arquitectura) Ed: Regional de Murcia. Pág: 257-281.

[2]Hernando J. Arquitectura en España 1.770-1.900, Ed: Cátedra. Pág: 385-419.



**Figura 1.** Villa Calamari



**Figura 2.** Huerto de las Bolas o Torre Llagostera.



**Figura 3.** Torre Calín.



**Figura 4.** Torre Asunción.



**Figura 5.** Finca Torre Nueva.



**Figura 6.** Finca Pérez Espejo.



**Figura 7.** Villa Pilar.



**Figura 8.** Villa María.

## Caracterización genética de la resistencia a *Meloidogyne incognita* de la línea de pimiento P26

F. Sánchez-Solana, C. Ros-Ibáñez, M.C. Martínez, A. Lacasa

Dpto. Biotecnología y Protección de Cultivos. IMIDA, C/ Mayor s/n, 30150 La Alberca (Murcia)  
fulgencio.sanchez8@carm.es

### RESUMEN

*Meloidogyne incognita* es uno de los principales patógenos del pimiento. En los últimos años las limitaciones en el uso de desinfectantes químicos han motivado el empleo de alternativas, como las resistencias genéticas. Se conocen tres genes mayores de resistencia frente al nematodo (Me1, Me3 y N). Se han encontrado variedades con resistencia parcial de naturaleza genética desconocida, como el caso de la línea P26 y cuya caracterización genética es el objetivo de este trabajo. Para ello P26 se ha cruzado con una línea susceptible (DLL) obteniéndose la F1, F2, y retrocruces BC1 y BC2, y se ha evaluado su nivel de resistencia frente a *M. incognita*. Los resultados revelan que se trata de una resistencia monogénica, de tipo cuantitativo con efectos aditivos, y con posibles interacciones con otros genes que modifican su expresión.

**Palabras clave:** nematodos, *Capsicum annuum*, mejora genética

### 1. Introducción

*Meloidogyne incognita* es un nematodo considerado como uno de los principales patógenos edáficos a escala mundial que afecta, entre otros cultivos, al pimiento (*Capsicum annuum* L.) provocándole daños en las raíces y ocasionando descensos importantes en sus cosechas [1]. En los últimos años, las restricciones en el uso de nematocidas y desinfectantes químicos han motivado el uso de resistencias genéticas como alternativa para el control del patógeno [2,3]. Consecuentemente, en la actualidad se están desarrollando programas de mejora genética con el fin de introducir los genes de resistencia en porta-injertos y variedades élite.

En pimiento se han identificado tres genes mayores de resistencia frente a *M. incognita*, denominados *Me1*, *Me3* y *N*, y localizados en la misma región cromosómica [4]. Sin embargo, tanto en condiciones controladas como en cultivo en campo, se han encontrado casos de poblaciones virulentas a algunos de estos genes que comprometen la eficacia de estas resistencias [3,5]. Además se han encontrado variedades con resistencia parcial [6,7] aunque no caracterizadas genéticamente, como el caso de la línea P26 (una selección del IMIDA). En trabajos anteriores, el comportamiento de dicha línea frente a *M. incognita* se ha testado en diferentes condiciones, observándose

diferencias funcionales respecto a las líneas portadoras de los genes *Me1*, *Me3* y *N* [6].

El objetivo del presente trabajo es conocer la naturaleza genética de la resistencia observada en la línea P26, tratando de averiguar si se trata de una resistencia mono o poligénica y su grado de aditividad y dominancia.

### 2. Materiales y Métodos

#### 2.1 Material vegetal

Partiendo de la línea resistente P26 y de una línea susceptible a *M. incognita*, DLL (Doux Long des Landes), se obtuvieron, mediante cruzamientos, las generaciones siguientes: F1 (P26xDLL); F2 (autofecundación de F1); y los retrocruces de la F1 con cada parental, BC1 ((P26xDLL)xP26) y BC2 ((P26xDLL)xDLL).

#### 2.2 Evaluación de la resistencia

Para conocer el valor fenotípico se testaron frente a *M. incognita* 10 plantas de las líneas parentales y F1, 136 plantas de la F2 y 73 plantas en el caso de las generaciones BC1 y BC2 (tabla 1). Cada planta, que se cultivó individualmente en maceta, se inoculó con una dosis de 400 juveniles de segundo estadio del nematodo y mantenida durante 8 semanas en condiciones ambientales controladas (temperatura 24±2 °C y

fotoperiodo de 16 h. de luz). Al cabo de este tiempo (duración de un ciclo del nematodo) se examinaron las raíces de cada planta obteniéndose el número total de masas de huevos, utilizado como parámetro de resistencia, ya que es equivalente al número de nematodos capaces de infestar a la planta.

### 2.3 Análisis estadístico

Los resultados encontrados para las generaciones F2, BC1 y BC2 se analizaron con el test de  $\chi^2$  para comprobar su ajuste al tipo de segregación mendeliana. La estimación de los parámetros genéticos de aditividad, dominancia y epistasia se llevó a cabo según el método descrito por Mather y Jinks [8]

## 3. Resultados y Discusión

Los valores medios del número de masas de huevos por planta en la línea P26 y DLL fueron 33 y 219 respectivamente El híbrido F1 (P26 X DLL) mostró un valor intermedio entre los dos parentales (111 masas de huevos), lo que indica el carácter cuantitativo-aditivo de la resistencia, y que contrasta con el carácter cualitativo-dominante de los genes Me y N [1,4].

El análisis de las clases fenotípicas obtenidas en las generaciones F2 y BC1 mostró un ajuste al modelo mendeliano con un solo gen implicado en el carácter resistente (tabla 1), y no por la acción de varios genes menores tal y como es el caso para la mayoría de caracteres cuantitativos [8,9]. Sin embargo en BC2 se obtuvieron diferencias significativas respecto al modelo propuesto explicables al incluir en el análisis de los datos posibles interacciones genéticas.

## 4. Conclusiones

Se ha determinado que la resistencia portada por la línea P26 es de tipo cuantitativo y naturaleza monogénica, considerando interesante llevar a cabo estudios más profundos, como la localización genómica y sus posibles interacciones con otros genes.

## 5. Agradecimientos

Equipos de Protección de Cultivos y de Horticultura del IMIDA, por su colaboración técnica y la proporción de P26. Dr. Rafael Fernández Muñoz por su asesoramiento en la interpretación de los datos. INIA por la financiación de la beca predoctoral de F. Sánchez-Solana.

## 6. Referencias bibliográficas

- [1] Djian-Caporalino C., Fazari A., Arguel M. J., Vernie T., VandeCastele C., Faure I., et al. 2007. Root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) Me resistance genes in pepper (*Capsicum annuum* L.) are clustered on the P9 chromosome. Theor Appl Genet 114: 473-486.
- [2] Djian-Caporalino C., et al.: Pyramiding, alternating or mixing: comparative performances of deployment strategies of nematode resistance genes to promote plant resistance efficiency and durability. BMC Plant Biology 2014 14:53.
- [3] Ros-Ibáñez C., Robertson L., Martínez-Lluch MC., Cano-García A., Lacasa-Plasencia A. 2014. Development of virulence to *Meloidogyne incognita* on resistant pepper rootstocks. Span J Agric Res 12(1): 225-232.
- [4] 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 N-gene co-localizes in the Me-genes cluster on the pepper (*Capsicum annuum* L.) P9 chromosome. Plant Breed. 131: 665-673.
- [5] Castagnone-Sereno P., Bongiovanni M., Palloix A., Dalmasso A. 1996. Selection for *Meloidogyne incognita* virulence against resistance genes from tomato and pepper and specificity of the virulence/resistance determinants. Eur. J. Plant Pathol. 102: 585-590.
- [6] Sánchez F., Ros C., Torres J., Hernández A., Martínez M. C., Bielza P., Costa J. 2012. Evaluación de genotipos de pimiento para su utilización en la mejora genética de porta-injertos resistentes a *Meloidogyne incognita*. Actas de Horticultura 62: 97-98.
- [7] Barbary A., Palloix A., Fazari A., Marteu N., P. Castagnone-Sereno P., C. Djian-Caporalino C. 2014. The plant genetic background affects the efficiency of the pepper major nematode resistance genes Me1 and Me3. Theor Appl Genet 127:499-507
- [8] Mather K., Jinks JL. 1971. Biometrical Genetics. The Study of Continuous Variation. 2nd ed. Chapman Et Hall, Great Britain. 382pp.
- [9] Cuartero J., Gómez-Guillamón M.L., Fernández-Muñoz R. 2012. Métodos clásicos en la mejora de caracteres cuantitativos en especies autóгамas. En J.J. Ferreira, A. Ordás y M. Pérez de la Vega (Eds.). La genética de los caracteres cuantitativos en la mejora vegetal del siglo XXI. SEG y SECH. Madrid. Págs 121-148.

**Tabla 1.** Número de plantas de cada fenotipo observadas para cada generación y comparación con los valores esperados.

Generación	Número de plantas				Ratio de segregación esperada	Valor $\chi^2$		Valor P
	Total	R	MR	S				
P26	10	10	-	-				
DLL	10	-	-	10				
F1	10	-	10	-				
F2	136	45	57	34	1:2:1 (R:MR:S)	5.34	< 5.99 (df = 2, $\alpha$ = 0.05)	0,069
BC1	73	37	36	-	1:1 (R:MR)	0.0001	< 3.84 (df = 1, $\alpha$ = 0.05)	1
BC2	73	-	46	27	1:1 (MR:S)	4.92*	> 3.84 (df = 1, $\alpha$ = 0.05)	0,026

R= resistentes; MR= parcialmente resistentes; S= susceptibles.

\* indica diferencias significativas entre valores observados y esperados.

## Efecto de las PGPR en la producción y vida útil del berro (*Nasturtium officinale*) cultivado en bandejas flotantes

D. Niñirola<sup>(1)</sup>, S. Nicola<sup>(2)</sup>, G. Pignata<sup>(2)</sup>, C. Egea-Gilabert<sup>(3)</sup>, J.A. Fernández<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Producción Vegetal, E.T.S. Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, C/Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena, España. dianicax@hotmail.com

<sup>(2)</sup> Dept. AGROSELVITER, VEGMAP, Università degli Studi di Torino, Via L. da Vinci 44, 10095 Grugliasco (TO), Italia.

<sup>(3)</sup> Ciencia y Tecnología Agraria, E.T.S. Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, C/Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena, España.

### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de bacterias promotoras del crecimiento (PGPR) sobre el rendimiento y la calidad de berro cultivado en bandejas flotantes. Para la obtención de las PGPR (*Bacillus subtilis*) se utilizó un producto comercial denominado Larminar®. El experimento consistió en cuatro tratamientos: Tratamiento 1 (T1) semillas y sustrato estéril inoculados con *B. subtilis*, Tratamiento 2 (T2) semillas y sustrato no estéril inoculado con *B. subtilis*, Tratamiento 3 (T3) semillas y sustrato estéril sin inocular y Tratamiento 4 (T4) las semillas y el sustrato no estéril sin inocular. En el momento de la cosecha se midieron diferentes parámetros agronómicos como el peso fresco y seco de parte aérea, el número de hojas, la altura de la planta, el área foliar, el color de las hojas, el contenido relativo en clorofila y el peso fresco y seco de las raíces. También se analizaron parámetros relacionados con la calidad, como la vitamina C, la capacidad antioxidante, el contenido de fenoles totales, el contenido de pigmentos, el pardeamiento y el contenido en o-quinona soluble, la actividad enzimática, el contenido de iones y contenido microbiano. La utilización de *B. subtilis* no afectó a la producción ni al desarrollo de la planta pero si aumentó la capacidad antioxidante y disminuyó el contenido en clorofilas a y b.

**Palabras clave:** *Bacillus subtilis*; *babyleaf*; Larminar®.

### 1. Introducción

El berro es considerado un alimento valioso en la industria de ensaladas frescas por su alto contenido de compuestos beneficiosos para la salud, tales como antioxidantes y compuestos fenólicos [1]. El sistema de cultivo en bandejas flotantes es una técnica de cultivo fácil y rentable. El uso de rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR) está ganando importancia y aceptación, debido al aumento significativo en el crecimiento y rendimiento de los cultivos en respuesta a la inoculación con PGPR [2]. Entre las cepas de PGPR, las especies pertenecientes a *Pseudomonas* y *Bacillus* son las más ampliamente estudiadas, en particular, algunas cepas de *Bacillus subtilis* que se utilizan como agentes de control biológico. El método de aplicación de las PGPR es esencial para evitar el fracaso en la colonización de la rizosfera. La inoculación directamente de semillas es el método más común de aplicación para los agentes bacterianos. Hasta el momento se ha prestado muy poca atención a los efectos de la

aplicación de PGPR sobre la vida útil de las hortalizas *babyleaf* producidas en el sistema de cultivo sin suelo. La mejora de la calidad del producto producida por las PGPR se puede asociar a cambios que favorecen la conservación del producto durante la etapa de post-cosecha [3].

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la aplicación de PGPR (*Bacillus subtilis*) sobre el rendimiento y calidad del berro cultivado en un sistema de bandejas flotantes a lo largo de su vida útil como un producto de IV Gama.

### 2. Materiales y Métodos

#### 2.1 Cepa bacteriana e inoculación

La cepa bacteriana utilizada en este estudio fue *Bacillus subtilis* AP-01, obtenida del producto comercial Larminar® (Agrimor).

La inoculación bacteriana se llevó a cabo en dos veces, la primera antes de la siembra por



inoculación de las semillas y el sustrato, y la segunda, dos semanas después de la siembra, remojando las bandejas en una suspensión del producto comercial, en ambos casos, se siguieron las instrucciones del fabricante. La suspensión bacteriana se obtuvo del crecimiento de las esporas de *B. subtilis* (Larminar® en polvo Agrimor, Agricultura Moderna SA, Madrid, España) en PlateCount Agar (PCA) (FlukaAnalítica, Sigma- AldrichSrl, Milán, Italia) que posteriormente se disolvieron en una solución salina de 9 g/l NaCl a una concentración de  $10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC)  $\text{ml}^{-1}$ . Antes de la inoculación, las semillas fueron desinfectadas en superficie mediante una dilución al 20 % de NaClO durante 3 minutos, se lavaron tres veces con agua destilada estéril, y se inocularon por inmersión durante 1 hora en la suspensión bacteriana (T1 y T2) o en solución salina (T3 y T4). Para secarlas completamente, las semillas se dispusieron en la cabina de flujo laminar para completar el proceso de desecación.

Para inocular el sustrato, cinco días antes de la siembra,  $0,5 \text{ kg m}^{-3}$  de Larminar® se mezclaron con sustrato esterilizado en el caso de T1 y T2. En ambos tratamientos una re-inoculación se realizó 15 días después de la siembra por inmersión de las bandejas en una solución que contenía  $1,67 \text{ gl}^{-1}$  de Larminar®.

## 2.2 Material vegetal, condiciones del cultivo y de la poscosecha

El experimento se llevó a cabo en el verano de 2012 en el Centro Experimental de la Facultad de Agricultura de Turín (Carmagnola (TO), Italia) en un invernadero de cristal con control automático de la temperatura ambiental. La temperatura máxima, mínima y media durante el ciclo de cultivo fueron del 43, 17 y 29,1°C, respectivamente.

El material vegetal utilizado fue un cultivar comercial de berros (*Nasturtiumofficinale* R. Br.) "LargeLeaf" (TozerSeeds Co., Cobham, Reino Unido). En el experimento las plantas crecieron en bandejas de espuma de poliestireno de 60 alveolos (cada alveolo tenía 44 mm de diámetro en la parte superior y 25 mm en la inferior), flotando de forma continua en una solución nutritiva.

La siembra se realizó el 22 de junio de 2012. Las bandejas de espuma de poliestireno se llenaron a mano con sustrato comercial a base de turba (NeuhausHuminsubstrat N17, Klasmann-Deilmann, Geeste-Gross, Hesepe, Alemania). El sustrato se desinfectó a 100°C durante 45 min para ser utilizado en los tratamientos T1 y T3. Las

bandejas sembradas se regaron por aspersión 2 veces al día hasta la germinación de las semillas, después se dispusieron en las mesas de flotación con la solución nutritiva. La densidad de plantación fue de  $2400 \text{ plantas m}^{-2}$ . La solución nutritiva consistió en un ratio 40/60  $\text{N-NO}_3^-/\text{N-NH}_4$ , compuesto por 12 mM de N, 6 mM K, 2 mM P, 2 mM Mg y 2,5 mM Ca. Para el NS se añadió un compuesto enriquecido con microelementos (INTRACHEM LysodinMultimix). El pH y la conductividad eléctrica de la solución se verificó semanalmente y se mantuvieron cerca de 5,5 (usando  $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ 1N}$ ) y  $2.000 \text{ mS cm}^{-1}$ , respectivamente. La solución nutritiva se aireó manteniendo el nivel de oxígeno disuelto en 5 ppm durante todo el ciclo.

Para el almacenamiento, el berro fue empacutado (125g) y termosellado en bolsas de 4 l de volumen, permeabilidad al  $\text{O}_2$  y al  $\text{CO}_2$  de  $1990$  y  $7800 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1} \text{ bar}^{-1}$ , respectivamente; espesor de película de 20 micras (AlvapackS.rl, Bologna, Italia). Las muestras envasadas fueron almacenadas en cámaras frigoríficas, sin luz y a 4°C durante 11 días.

## 2.3 Análisis agronómicos y bioquímicos

La recolección se llevó a cabo el 17 de julio 2012 después de un ciclo de cultivo de 26 días. Se midieron el peso fresco y seco de parte aérea, número de hojas, altura de la planta, área foliar (utilizando un análisis de imágenes con ImageJ 1.47v, NIH), color de las hojas usando un colorímetro CR10 (Konica-Minolta Sensing Inc., Osaka, Japón), el contenido relativo en clorofila RCC (Minolta SPAD -502; Konica -Minolta Sensing Inc., Osaka, Japón) y peso fresco y seco de las raíces.

También se analizaron la vitamina C que fue determinada como describen Zapata y Dufour (1992). Capacidad antioxidante siguiendo los procedimientos de Benzie y Strain (1996) (FRAP). Los fenoles totales (TP) se determinaron usando el procedimiento de Folin-Ciocalteu basado en el método de Singleton y Rossi (1965). La clorofila a, clorofila b y carotenoides (Chl. a, Chl b y Car, respectivamente) se determinaron según el método Lichtenthaler y Wellburn (1983). El pardeamiento y la o-quinona soluble (BP y So- Q, respectivamente) se determinaron de acuerdo con el método Tardelli et al. (2013). La actividad peroxidasa (POD) se determinó como se describe en Nickel and Cunningham (1969). La actividad de polifenol oxidasa (PPO) se determinó como describe Degl'Innocenti et al. (2005). La actividad fenilalanina amonio liasa (PAL) se determinó como se describe en Campos et al.

(2004) y Degl'Innocenti et al. (2005). Todos los análisis espectrofotométricos se llevaron a cabo usando un espectrofotómetro Beckman DU®-65 espectrofotómetro (BeckmanCoulter Inc., Fullerton, CA, EE.UU.). El contenido de iones se determinó usando un kit refractométrico (Merck Reflectoquant RQflex2©, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Recuento total de bacterias (TBC) se determinó mediante un cultivo en agar (PCA) (Fluka Analítica, Sigma-Aldrich Srl, Milán, Italia), mientras que la levadura y el recuento de mohos (YC y MC) se determinaron utilizando el agar cloranfenicol glucosa extracto de levadura (Fluka Analítica, Sigma-Aldrich Srl, Milán, Italia). La enumeración de TBC se realizó después de la incubación a 30°C durante 48h. La enumeración de TA y MC se realizaron después de la incubación a 30°C durante 5 días. Los resultados se expresaron como CFUg<sup>-1</sup> FW.

**2.4 Análisis estadístico**

El experimento incluyó los siguientes tratamientos: Tratamiento 1 (T1) las semillas y sustrato estéril (SE) inoculado con Larminar® (SB), Tratamiento 2 (T2) semillas y sustrato no estéril (NE) inoculado con Larminar® (SB), Tratamiento 3 (T3) semillas y sustrato estéril (SE) sin inocular (NB) y Tratamiento 4 (T4) las semillas y el sustrato no estéril (NE) sin inocular (NB).

El experimento consistió en bloques aleatorios con 3 réplicas por tratamiento, cada réplica se situó en una mesa de flotación, cada mesa de flotación tenía 12 bandejas.

**3. Resultados y Discusión**

Los resultados de los parámetros medidos de la parte agronómica que mostraron diferencias significativas se recogen en la Tabla 1. Los valores mayores se dieron en el tratamiento de sustrato esterilizado (SE) para la altura de las plantas, el número de hojas y el contenido relativo en clorofila (SPAD). Por el contrario, para el croma los valores más elevados se dieron en el tratamiento del sustrato no esterilizado (NE).

En relación a la actividad microbiana no hubo diferencias significativas para los conteos de bacterias y levaduras (datos no mostrados) pero se obtuvieron diferencias significativas para los hongos entre los tratamientos con NE y SE dando un valor mayor en el NE. Además, destaca la interacción entre los factores Esterilidad y Bacteria para la altura de la planta (Gráfica 1A).

**Tabla 1.** Resultados agronómicos y microbiológicos.

Los valores dentro de la misma fila seguidos por una letra minúscula diferente son significativamente diferentes para P≤0,05. Los asteriscos indican la significancia: \* P ≤ 0,05; \*\* P ≤ 0,01; \*\*\* P ≤ 0,001; ns= no significativa.

De estos resultados agronómicos podemos destacar que la adición del Larminar® no influyó

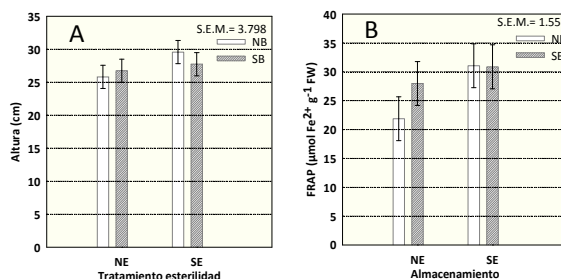
	Esteril (A)		Larminar®(B)		Interacción		
	NE	SE	NB	SB	A	B	AxB
Altura (cm)	26,3 a	28,7 b	27,7	27,2	**	ns	*
Hojas/planta	10,7 a	12,0 b	11,3	11,4	***	ns	ns
Chroma	38,0 b	36,6 a	37,5	37,1	*	ns	ns
SPAD	33,9a	36,6 b	34,6	35,8	**	ns	ns
MC (Log UFC)	2,3 b	2,1 a	2,2	2,2	*	ns	ns

en ninguno de los parámetros medidos. Por el contrario, la esterilización del sustrato dio lugar a plantas más desarrolladas, con un color menos saturado y mayor contenido relativo en clorofila.

También se observó que la esterilización evitó una mayor proliferación de hongos en la parte aérea de la planta al final del cultivo. De la explicación de la interacción entre la esterilización y la adición del Larminar® con respecto a la altura se puede apreciar que las plantas con tratamiento NE y NB fueron significativamente más bajas que las plantas con los tratamientos SE y NB.

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para cada parámetro según el factor de almacenamiento (inicio o final), esterilidad del sustrato. Durante el almacenamiento los valores de O<sub>2</sub> fluctuaron entre 18,8 kPa del inicio del almacenamiento a 1,63 para T1, 1.65 para T2, 1,15 para T3 y 0,7 para T4. Los valores

**Figura 1.** Efecto de la inoculación con Larminar® sobre la altura (A) según el tratamiento de esterilidad y sobre el FRAP (B) según el almacenamiento. Los valores son la media de tres repeticiones y las líneas verticales son la



diferencia menos significativa intervalos (LSD) a P ≤ 0.05.

Tabla 2: Influencia del almacenamiento, el tratamiento de esterilidad y la adición de Larminar® sobre los parámetros bioquímicos.

	FRAP ( $\mu\text{molFe}^{2+} \text{g}^{-1}$ FW)	TP (mg ac. Gálico $\text{g}^{-1}$ FW)	Chl. a ( $\text{mg g}^{-1}$ FW)	Chl. b ( $\text{mg g}^{-1}$ FW)	Vitamina C ( $\text{mg /100g}$ FW)	BP (raw abs. units FW)	So-Q (raw abs. units FW)	POD ( $\Delta\text{A min}^{-1} \text{g}^{-1}$ FW)	PPO (PPO Unit $\text{g}^{-1}$ FW)	PAL ( $\mu\text{mol}$ cinnamic acid $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ FW)	Nitratos ( $\text{mg g}^{-1} \text{NO}_3$ )
Inicio	24,9 a	0,9 b	0,5 b	0,2 b	2,6	0,7 a	0,4	3,2 a	6,5 a	0,1 a	2,2 b
Final	30,9 b	0,7 a	0,4 a	0,1 a	2,3	1,0 b	0,4	4,7 b	31,4 b	0,2 b	1,7 a
NE	24,9 a	0,7 a	0,4 a	0,1 a	2,0 a	0,9	0,5	4,2	19,5	0,1	2,5 b
SE	30,8 b	0,8 b	0,5 b	0,2 b	2,9 b	0,9	0,3	3,7	18,4	0,1	1,4 a
NB	26,5 a	0,8	0,5 b	0,1 b	2,2	0,9	0,4	3,8	19,2	0,1	1,8
SB	29,3 b	0,9	0,4 a	0,1 a	2,7	0,9	0,4	4,1	18,7	0,1	2,0
Almacen. (A)	**	***	***	***	ns	**	ns	*	***	***	*
Esteril (B)	**	**	**	***	*	ns	ns	ns	ns	ns	***
Larminar®(C)	*	ns	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AxB	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AxC	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BxC	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AxBxC	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Los valores dentro de la misma columna seguidos por una letra minúscula diferente son significativamente diferentes para  $P \leq 0,05$ . Los asteriscos indican la significancia: \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; ns= no significativa.

del  $\text{CO}_2$  se iniciaron en 0,4 y al final de los 11 días de almacenamiento tuvieron valores de 8,47 para T1, 8,6 para T2, 8,1 para T3 y de 8,8 para T4.

Con respecto al almacenamiento, los valores significativamente mayores se dieron al inicio en TP, Chl. a, Chl. b y en el contenido en nitratos. Por el contrario FRAP, BP, POD, PPO y PAL, mostraron los valores significativamente mayores para el final del almacenamiento. En relación a la esterilidad del sustrato, los valores significativamente más elevados se dieron en el tratamiento SE para FRAP, TP, Chl.a, Chl.b y en el contenido en vitamina C. Por el contrario, el contenido en nitratos mostró el valor significativamente mayor con el tratamiento de NE. En el caso de la adición de bacterias, se obtuvo el valor significativamente más elevado en el tratamiento SB para el FRAP y los valores significativamente mayores de NB en las Chl a y b. Las clorofilas se comportaron de forma contraria a los resultados obtenidos por Han y Lee (2005) para lechuga bajo estrés tratada con PGPR. Cabe destacar las dos interacciones dobles entre el Almacenamiento y las Larminar® para el FRAP (Gráfica 1B) y entre Almacenamiento y la Esterilidad para el TP (no mostrada). La interacción de la Gráfica 1B muestra que los resultados de FRAP para las plantas con sustrato sin esterilizar (NE) y sin Larminar® (NB) fueron significativamente menores a los de los tratamientos de sustrato estéril (SE) con (SB) y sin Larminar® (NB). El aumento de la capacidad antioxidante con el uso de las PGPR concuerda con los resultados obtenidos por Olalde-Portugal y Mena-Violante(2008) y Ordookhani et al.,(2010) en frutos de tomate.

#### 4. Conclusiones

La inoculación mediante el producto Larminar no produjo efecto sobre el desarrollo del berro, aunque si se vieron sus efectos sobre la capacidad antioxidante y las clorofilas a y b. La planta se vio beneficiada por la esterilización del sustrato ya que favoreció su desarrollo y el aumento de FRAP, TP, clorofilas a y b y vitamina C. Con el almacenamiento aumentó el FRAP, el pardeamiento y la actividad enzimática.

#### 5. Agradecimientos

Department of Agricultural, Forest and Food Sciences. Università di Torino.

#### 6. Referencias bibliográficas

- [1] Martínez-Sánchez A., Gil-Izquierdo A., Gil M.I., Ferreres F. 2008. A Comparative Study of Flavonoid Compounds, Vitamin C, and Antioxidant Properties of Baby Leaf Brassicaceae Species. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 2330–2340.
- [2] Kloepper J.W., Leong J., Teintze M., Schroth M.N. 1980. Enhancing plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. *Nature* 286:885–886.
- [3] Olalde-Portugal, V., and H. G. Mena-Violante. 2008. Symbiotic associations with bacteria and fungi and its effect on fruit quality. *Postharvest Biology and Technology of Fruits, Vegetables and Flowers.* Wiley-BlackWell, Canada. Pag: 360-372.
- [4] Han H.S., Lee K.D. 2005. Plant Growth Promoting Rhizobacteria Effect on Antioxidant Status, Photosynthesis, Mineral Uptake and Growth of Lettuce under Soil Salinity. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 1(3): 210-215.
- [5] Ordookhani K., Khavazi K., Moezzi A., Rejali F. 2010. Influence of PGPR and AMF on antioxidant activity, lycopene and potassium contents in tomato. *African Journal of Agricultural Research* Vol. 5(10), pp. 1108-1116.

## Efectos de la sobreproducción de ácido abscísico y citoquininas en la respuesta fisiológica y agronómica de tomate bajo estrés salino en invernadero

A. Martínez-Pérez, A. Albacete, M.P. Sánchez-Iglesias, F. Pérez-Alfocea, C. Martínez-Andújar

Departamento Nutrición Vegetal, CEBAS-CSIC. Campus de Espinardo. 30100. Murcia, España  
amperez@cebas.csic.es

### RESUMEN

La salinidad limita la productividad de los cultivos y modifica el balance hormonal vegetal. El ácido abscísico (ABA) y las citoquininas (CKs) son fitohormonas que median la respuesta a estreses abióticos y se considera que son producidas principalmente en la raíz. Para evaluar el papel de estas dos hormonas en el crecimiento y productividad de los cultivos bajo salinidad, se realizaron injertos cuyo portainjerto eran unas variedades transgénicas de tomate que sobreproducían ácido abscísico (ABA) (líneas *NCED*) y citoquininas (líneas *IPT*), utilizando una variedad comercial de tomate cherry como injerto. Las plantas de tomate injertadas fueron cultivadas en un invernadero comercial durante 6 meses en condiciones de salinidad moderada. Las plantas cuyo portainjerto era una variedad transgénica eran más vigorosas y presentaban mayor producción que las que tenían como portainjerto una planta *wild type* o la propia parte aérea injertada. Los análisis hormonales no explican completamente estos datos, por lo que otros tipos de análisis (genéticos, enzimáticos) son necesarios para explicar completamente estos datos.

**Palabras clave:** Fitohormonas; transgénicos; injertos; salinidad.

### 1. Introducción

La salinidad es el mayor factor limitante en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Las estrategias que permiten a las plantas enfrentarse al estrés salino incluyen cierre estomático parcial, alteración en el metabolismo para desviar asimilados hacia la raíz, inhibición del crecimiento, senescencia foliar y por último abscisión [1]. Como organismos sésiles, las plantas perciben las condiciones medioambientales y generar señales sistémicas (en los tejidos expuestos al estrés) para coordinar los ajustes metabólicos y de desarrollo. Bajo condiciones de salinidad y sequía, las señales relacionadas con el estrés inducen cambios en la expresión génica específica que puede ser mediada por señales hidráulicas o químicas, en las que la mayoría de grupos de hormonas vegetales (ácido abscísico – ABA-, etileno, citokininas –CK- y ácido jasmónico –JA-) son de vital importancia [2, 3]. Los trabajos recientes sugieren que la mayor parte de las fitohormonas están implicadas no sólo en la regulación del crecimiento bajo condiciones de estrés abiótico, sino también en otros procesos

clave como la adquisición de recursos (agua y nutrientes), de forma directa a nivel radical a través de la actividad y expresión de transportadores, o bien de forma indirecta alterando el crecimiento y desarrollo de la raíz.

El ácido abscísico (ABA) y las citoquininas (CKs) son hormonas que median la respuesta de la planta al estrés y se considera que son producidas mayoritariamente en la raíz. En la investigación sobre comunicación raíz-parte aérea es aún incierto si los cambios hormonales en la parte aérea bajo estrés salino se deben a cambios en su exportación desde la raíz, o a cambios metabólicos locales en la hoja. Los datos contradictorios existentes acerca del papel de las hormonas de la raíz y su impacto en la fisiología de la parte aérea, sugieren que el papel de las hormonas sintetizadas en la raíz CKs y ABA en la regulación de las respuestas de la parte aérea requiere una reevaluación.

La disponibilidad de plantas transgénicas con distinta gradación en la producción de ABA (plantas que sobreexpresan *NCED*, cis-epoxycarotenoid dioxygenasa) y CKs, de nuevos sistemas de microarray para el análisis de la

expresión génica, de ensayos optimizados para actividades enzimáticas, y la facilidad de realizar injertos en tomate, nos permite realizar una aproximación a distintos niveles (molecular / bioquímica / fisiológica / agronómica) de la implicación del ABA y las CKs en la regulación del crecimiento de la raíz y de la parte aérea, así como de la producción, bajo estrés salino, con objeto de poder mejorar la tolerancia.

El objetivo de este trabajo es comprobar el efecto de la sobreproducción de ABA y CKs sobre el crecimiento y la producción de plantas de tomate cultivadas en condiciones de salinidad.

## 2. Materiales y Métodos

Se utilizaron dos sets independientes de plantas. El primer set de plantas disponía de dos líneas funcionales sobreproductoras de ABA, denominadas sp12 y sp5 (*sp::LeNCED1-12* y *sp::LeNCED1-5*), que sobreexpresan el gen *NCED* de tomate bajo un promotor constitutivo [4], y su respectivo Wild Type (*WT*) Ailsa Craig (*AC*). El segundo set de plantas disponía de dos líneas funcionales sobreproductoras de CKs, denominadas iptF e iptG (*35S::IPT*) que sobreexpresa el gen *IPT* de *Agrobacterium tumefaciens* bajo el promotor constitutivo 35S, y su respectivo *WT* UC82B.

Las semillas de los genotipos anteriormente citados fueron sembradas en semilleros con vermiculita y humedecidas con disolución de Hoagland semiconcentrada. Entre 30 y 45 días (en función de la velocidad de germinación de cada genotipo) después de la siembra, cuando las plantas tenían entre 4 y 6 hojas verdaderas, se realizaron los injertos. Los genotipos citados anteriormente fueron utilizados como portainjerto de una variedad cherry comercial denominada Sugar Drop (*SD*), dando lugar a las siguientes combinaciones de injertos: *SD/AC*, *SD/sp12*, *SD/sp5*, *SD/UC82B*, *SD/iptF*, *SD/iptG*. Como control del experimento se utilizó la variedad comercial autoinjertada (*SD/SD*) y sin injertar (*SD*). Se realizó un injerto en bisel, tras el cual se mantuvieron dichas plantas injertadas una semana en condiciones de semioscuridad y 100% de humedad relativa: Transcurrida una semana las plantas se fueron aclimatando de forma progresiva hasta alcanzar una humedad relativa del 60%. Dos semanas más tarde las plantas fueron transferidas a un invernadero comercial, donde permanecieron 6 meses en cultivo enarenado y regadas con agua cuya conductividad era de aproximadamente 3µS/cm. Durante el tiempo que las plantas

permanecieron en el invernadero se analizaron los parámetros relacionados con el crecimiento vegetativo y la producción. Se recolectaron muestras de hoja, fruto, xilema y floema de hoja de diferentes estadios para su posterior análisis hormonal (UHPLC-MS). Al final del ensayo se midió el crecimiento vegetativo de la planta, se analizó la producción y se recolectó xilema de raíz y muestra de raíz para su posterior análisis hormonal. La fotosíntesis y el intercambio gaseoso se midieron en varias ocasiones a lo largo del cultivo utilizando un ADC (*Analytical Development Company*), modelo LCA 4.

## 3. Resultados y Discusión

Los resultados apuntan a una ventaja en términos de vigor vegetativo de las líneas transgénicas sobreproductoras de ABA y CKs utilizadas como portainjerto de la variedad comercial *SD* comparando con sus respectivos controles. El peso fresco de la hoja y el área foliar se redujo significativamente en la combinación *SD/AC*, por lo que parece ocurrir cierta incompatibilidad entre la variedad comercial utilizada en éste ensayo y el patrón *AC*. A pesar de ésta incompatibilidad observada el uso de las líneas transgénicas sp12 y sp5 como portainjertos de la variedad comercial combinaciones *SD/sp12* y *SD/sp5* dió lugar a un aumento significativo del vigor de la hoja respecto a su *WT AC* injertado sobre *SD (SD/AC)* y a la variedad *SD* injertada sobre sí misma (*SD/SD*) (Figura 1). El *WT UC82B* presentó mayor vigor que *AC* y ninguna incompatibilidad con el injerto *SD*. Las líneas transgénicas iptF e iptG utilizadas como portainjerto de la variedad comercial (*SD/iptF* y *SD/iptG*) fueron las más vigorosas de todas las combinaciones de injertos utilizadas presentando un incremento significativo del peso fresco de la hoja y del área foliar respecto de su *WT* injertado sobre *SD (SD/UC82B)* y la variedad *SD* autoinjertada (*SD/SD*) (Figura 1).

En cuanto a los parámetros relacionados con la producción, tanto la longitud de los racimos como el peso fresco de los mismos fue significativamente superior en las 4 combinaciones en las que utilizamos líneas transgénicas como portainjertos de la variedad comercial (*SD/sp12*, *SD/sp5*, *SD/iptF* y *SD/iptG*), comparados con sus respectivos *WT* utilizados como portainjertos de *SD (SD/AC* y *SD/UC82B)*, y con la variedad comercial autoinjertada (*SD/SD*).

Las concentraciones de ABA encontrados en el xilema de la hoja 80 días después del trasplante (DDT), al contrario de lo que cabría esperar dada la función del transgén, fueron inferiores en las combinaciones de injertos con las líneas transgénicas sp12 y sp5 (SD/sp12 y SD/sp5) que en las combinaciones SD/AC y SD/SD. Las concentraciones de CKs observadas en las combinaciones con raíces transgénicas resultaron mayores que en las combinaciones con sus respectivos WT, siendo los niveles de CKs mayores en las combinaciones SD/iptF y SD/iptG (Figura 3b).

Aunque en plantas injertadas el injerto siempre tiene una mayor efecto que el portainjerto, se ha visto que portainjertos de plantas *wild type* pueden restaurar parcialmente el crecimiento y el contenido foliar de ABA en injertos de *flacca* (mutantes deficientes en ABA) [5, 6], indicando así que el ABA sintetizado en la raíz puede influenciar la fisiología de la parte aérea, aunque bajo condiciones de cultivo óptimas, la sobreexpresión del gen *NCED* solamente en la raíces no produce niveles suficientes de ABA para incrementar los niveles en la parte aérea [7]. Del mismo modo, la sobreexpresión del gen *IPT* solamente en la raíz, incrementó la concentración de CKs bioactivas en raíz, savia xilemática y parte aérea [8].

#### 4. Conclusiones

Entender el papel de una hormona específica en respuesta a la salinidad es difícil ya que, a) la salinidad modifica simultáneamente las concentraciones de varias hormonas vegetales y b) dos hormonas pueden influir de forma recíproca en la síntesis, transporte o sensibilidad la una de la otra. Es sorprendente en el caso de este ensayo como dos transgénesis completamente distintas pueden dar lugar a resultados similares, como son el incremento del crecimiento vegetativo y de la longitud y peso de los racimos. Existen otros factores, no se sabe si mediados o no por las hormonas, o por algunos de sus precursores o derivados, que están afectando a estas plantas a otro nivel que no es sólo el hormonal y que requiere reevaluación y análisis genéticos y enzimáticos para completar el ensayo.

#### 5. Agradecimientos

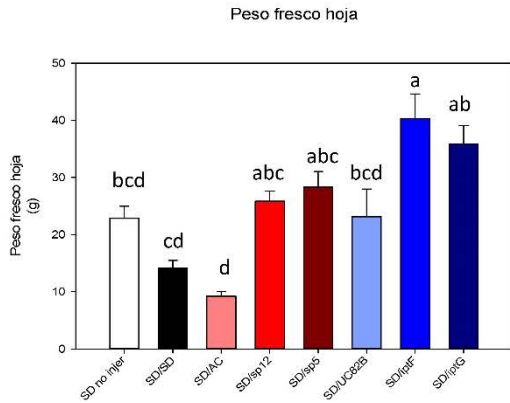
Los autores de la presente comunicación desean agradecer a Andrew J. Thompson de la Universidad de Cranfield (Reino Unido) y a Ann C. Smigocki del Molecular Plant Pathology

Laboratory (EEUU) por los sets de semillas *NCED* e *IPT* respectivamente. Este trabajo ha sido financiado por CICYT AGL2011-27996 y ROOTOPOWER (REF: 289365. FP7-KBBE-2011-5 European Union)

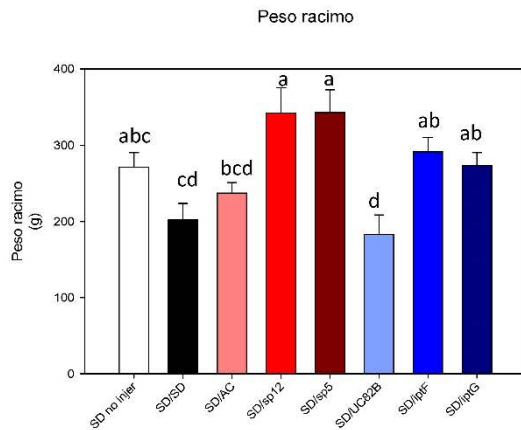
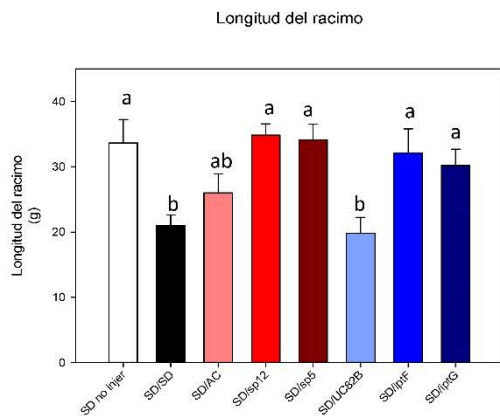
#### 6. Referencias bibliográficas

- [1] Munns R., Tester M. 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681
- [2] Chaves M.M., Flexas, J., Pinheiro C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* 103: 551-560.
- [3] Pérez-Alfocea F., Albacete A., Ghanem M.E., Dodd I.C. 2010. Hormonal regulation of source-sink relations to maintain crop productivity under salinity: a case study of root-to-shoot signaling in tomato. *Functional Plant Biology* 37: 592-603.
- [4] Thompson A.J., Jackson A.C., Symonds R.C., Mulholland B.J., Dadswell A.R., Blake P.S., Burbidge A., Taylor I.B. 2000. Ectopic expression of tomato 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene causes over-production of abscisic acid. *The Plant Journal* 23: 363-374.
- [5] Dodd I.C., Theobald J.C., Richer S.K., Davies W.J. 2009. Partial phenotypic reversion of ABA-deficient *flacca* tomato (*Solanum lycopersicum*) scions by a wild-type rootstock: normalizing shoot ethylene relations promotes leaf area but does not diminish whole plant transpiration rate. *Journal of Experimental Botany* 60: 4029-4039.
- [6] Chen G., Fu X., Herman Lips S., Sagi M. 2003. Control of plants growth resides in the shoot, and not in the root, in reciprocal grafts of *flacca* and wild-type tomato (*Lycopersicon esculentum*), in the presence and absence of salinity stress. *Plant and Soil* 256: 205-215.
- [7] Thompson A.J., Andrews J., Mulholland B.J., McKee J.M.T., Hilton H.W., Horridge J.S., Farquhar G.D., Smeeton R.C., Smillie I.R.A., Black C.R., Taylor I.B. 2007. Overproduction of abscisic acid in tomato increases transpiration efficiency and root hydraulic conductivity and influences leaf expansion. *Plant Physiology* 143: 1905-1917
- [8] Ghanem M.E., Albacete A., Smigocki A.C., Frévort I., Pospisilova H., Martínez Andújar C., Acosta M., Sánchez-Bravo J., Lutts S., Dodd I.C., Pérez-Alfocea F. Root synthesized cytokinins improve shoot growth and fruit yield in salinized tomato (*solanum lycopersicum* L.) plants. 2011. *Journal of Experimental Botany* 62: 125-140.

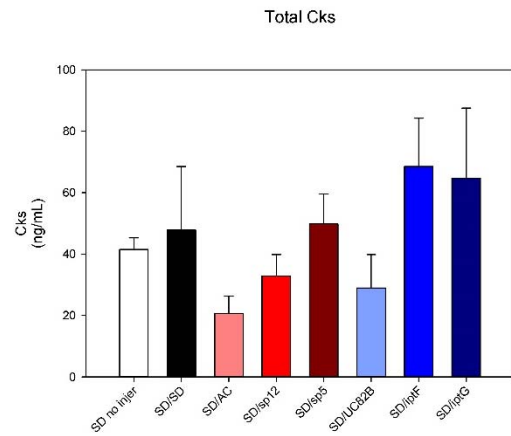
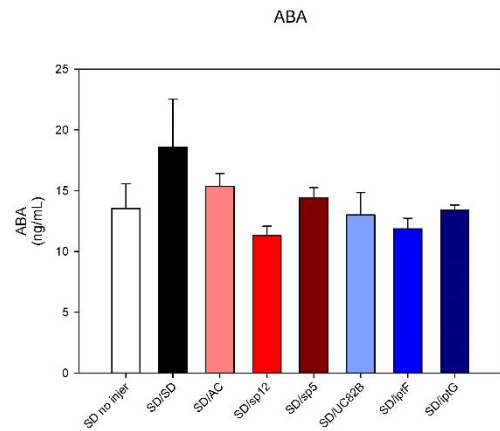
**Figuras**



**Figura 1.** Peso fresco de hoja por encima del cuarto racimo 80DDT.



**Figuras 2 a y b.** Longitud (a) y peso(b) del 4º racimo maduro 120 DDT.



**Figuras 3 a y b.** Concentración hormonal de ABA (a) y CKs (b) en savia xilemática procedente de la hoja por encima del cuarto racimo 80DDT.

# Contracción temprana de diámetro del tronco. Un nuevo indicador altamente sensible al estrés hídrico en nectarinos extratempranos

J.M. de la Rosa, M.R. Conesa, R. Domingo, A. Pérez

Dpto. Producción Vegetal ETSIA. Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). Paseo Alfonso XIII, 52, E-30203 Cartagena, España. Josem.delarosa@upct.es

## RESUMEN

Se evaluó la sensibilidad al estrés hídrico de diferentes indicadores de estado hídrico de la planta durante dos años consecutivos en nectarinos extratempranos. Las medidas se realizaron durante la poscosecha y se aplicaron dos tratamientos de riego: i) control (CTL), regado al 120% de la evapotranspiración de cultivo a fin de lograr condiciones no limitantes de agua en el suelo; ii) Tratamiento deficitario (DI), que recibió en torno a un 40 % menos de riego durante la poscosecha. Los indicadores de estado hídrico evaluados fueron: potencial hídrico de tallo al mediodía ( $\Psi_{stem}$ ) y parámetros derivados de las fluctuaciones de diámetro de tronco (FDT): máxima contracción diaria (MDS), contracción temprana entre las 9 y las 12 hora solar (EDS), y contracción tardía (LDS) entre las 12 hora solar hasta el mínimo diámetro de tronco. El indicador más sensible (relación de la intensidad de señal y el ruido) fue  $\Psi_{stem}$  junto con EDS. La intensidad de señal de EDS fue mayor que la de  $\Psi_{stem}$ , aunque con mayor variabilidad. EDS fue mejor indicador que MDS, con alta IS y similar variabilidad. La relación de MDS con  $\Psi_{stem}$  fue curvilínea con un máximo en -1.5 MPa. En cambio, EDS se relacionaba linealmente con  $\Psi_{stem}$ . Son necesarios otros estudios para determinar la sensibilidad al déficit hídrico de EDS en otras especies.

**Palabras clave:** máxima contracción de tronco, contracción temprana de tronco, potencial hídrico de tallo y estrés hídrico.

## 1. Introducción

La escasez de los recursos hídricos que sufren las zonas áridas de España y de otros países obliga a los agricultores a optimizar los recursos hídricos. Para tales fines la utilización de las medidas de los indicadores del estado hídricos de las plantas se presenta como una herramienta prometedora. Las principales cualidades deseables que debe mostrar un indicador son: sensibilidad al estrés hídrico y ser automatizable.

El objetivo de este trabajo es estudiar la sensibilidad de diferentes indicadores tradicionales: potencial hídrico de tallo al mediodía ( $\Psi_{stem}$ ); máxima contracción diaria (MDS) y dos nuevos indicadores derivados de a las FDT: contracción temprana del tronco (EDS) y contracción tardía del tronco (LDS).

## 2. Materiales y Métodos

El estudio se llevó a cabo durante dos años consecutivos (2009 y 2010) en una finca comercial localizada en Campotejar (38° 8'N; 1° 13'W). La parcela experimental tenía un área de 2 ha de nectarino cv "Flanoba" injertados sobre híbrido GF-677 en un marco de plantación de 5.5x3.5 m. Los tratamientos de riego fueron: i) Control (CTL), regado al 120% de la evapotranspiración potencial de cultivo (ETc) a fin de mantener condiciones no limitantes de agua en el suelo y ii) un tratamiento de riego deficitario (DI), que recibió un 40% menos de riego en la poscosecha de 2009 mientras que en 2010 el déficit hídrico aumentó gradualmente desde el 20% al 70%.

El diseño experimental consistió en 3 repeticiones por tratamiento distribuidas al azar. Cada repetición estaba compuesta por 3 filas de 15 árboles cada una de ellas. Las medidas se realizaron en los árboles de la fila central.



Las fluctuaciones de diámetro de tronco (FDT) fueron monitoreadas mediante 6 sensores de desplazamiento lineal (LVDT; Solartron Metrology, Bognor Regis, UK, model DF  $\pm$  2.5 mm, precision  $\pm$  10  $\mu$ m) instalados en el lado norte de los troncos a 30 cm de altura y sobre portasensores de aluminio e invar (una aleación compuesta por 64% de Fe y 35% de Ni que presenta dilataciones térmicas mínimas. Las medidas se tomaban cada 30s y se recogían medias cada 10 minutos con un data logger CR10X (Campbell Scientific, Inc., Logan, USA). A partir de las FDT se determinaron varios índices: máximo (MXDT) y mínimo (MNNT) diámetro de tronco y máxima contracción diaria (MDS=MXDT-MXNT). Además se determinaron dos nuevos parámetros: contracción temprana de tronco (EDS), que tenía lugar entre las 9 y el mediodía solar y contracción tardía de tronco (LDS) que ocurría entre el mediodía y el momento en el que se alcanzaba el mínimo diámetro de tronco (en torno a las 16:00, hora solar).

El potencial hídrico de tallo al mediodía ( $\Psi_{stem}$ ) se midió cada 7-10 días en hojas sanas, adultas, cercanas al tronco y envueltas con film de plástico y papel de aluminio al menos dos horas antes de su medida. La medida se realizó en una hoja de cada árbol monitoreado con sensor. Para las medidas se utilizó la cámara de presión (Soil Moisture Equipment Crop. Model 3000).

El 26 de agosto de 2010 se midió la conductancia estomática (Gs) desde las 5 y hasta las 19 (hora solar), cada dos horas con CIRAS2 (PPSystem, Hitchin, Herfordshire, UK). Las medidas se realizaron en hojas soleadas, adultas y sanas en cada árbol monitoreado con sensor.

La sensibilidad al estrés hídrico de los indicadores se avaluó usando la metodología propuesta por Goldhamer y Fereres (2001) [1]. La intensidad de señal (IS) se calculó mediante la relación de los valores del tratamiento deficitario y los del control y la sensibilidad como la relación entre la IS y el coeficiente de variación (ruido) de las medidas. A fin poder comparar las sensibilidades de cada indicador solamente se utilizaron los datos de los días en que se tenían medidas de todos los indicadores.

Las relaciones entre indicadores fueron estudiadas mediante análisis lineal y no-lineal. El coeficiente de determinación ( $r^2$ ) se utilizó para evaluar el ajuste de las regresiones. El análisis de varianza (ANOVA) se utilizó para evaluar las diferencias entre tratamientos. Todos los análisis se llevaron a cabo con el

software (Statgraphics Plus for Windows versión 4.1).

### 3. Resultados y Discusión

Los valores de  $\Psi_{stem}$  variaron de acuerdo a las variables climáticas, entre -0.4 y -1.06 MPa en CTL durante los dos años de estudio. El valor mínimo alcanzado por DI fue -1.78 y -2.08 MPa en 2009 y 2010, respectivamente.

MDS, EDS y LDS presentaron alta dependencia con las variables meteorológicas. De la Rosa *et al.* (2013) [2] mostró estrechas correlacionado de MDS con  $VPD_{mx}$  y  $T_{mx}$ , en nectarinos bien regados de la misma parcela. Durante el periodo experimental los valores medios de MDS, EDS y LDS fueron 230 y 335  $\mu$ m, 87 y 165  $\mu$ m y 125 y 134  $\mu$ m, para CTL y DI, respectivamente.

Durante el periodo de déficit  $IS_{MDS}$ ,  $IS_{EDS}$ ,  $IS_{LDS}$  y  $SI_{\Psi_{stem}}$  promediaron 1.5 y 1.7, 1.9 y 2.3, 1.0 y 1.2 y 1.4 y 1.5, para 2009 y 2010, respectivamente.  $IS_{EDS}$  fue claramente superior a las de los otros indicadores. En 2009 todos los indicadores disminuyeron los valores de IS al final del periodo, cuando la demanda atmosférica bajó. En cambio, en 2010,  $IS_{EDS}$  y  $SI_{\Psi_{stem}}$  fue elevada (2.8 y 2.7) al final del periodo, cuando el déficit era severo (reducción del 70% del riego en DI), mientras que  $IS_{MDS}$  y  $IS_{LDS}$  fue de 1.4 y 0.7, respectivamente.

Para explicar por qué  $IS_{EDS}$  muestra valores mucho más altos que los de  $IS_{LDS}$  hay que tener en cuenta que la contracción del tronco se produce cuando las pérdidas de agua mediante transpiración son mayores que las entradas de agua por absorción radicular (Ortuño *et al.* 2010 [3]). Por la mañana la conductancia estomática es similar en ambos tratamientos (Figura 1) por lo que la contracción del tronco en DI es mayor ya que la absorción radicular en este tratamiento es menor por tener menos agua en el suelo y estar ésta más fuertemente retenida (datos no mostrados). Por la tarde la menor absorción radicular en DI se compensa con las menores pérdidas de agua debidas a un importante cierre estomático (Figura 1). Por esta razón CTL puede mostrar valores de LDS mayores que los de DI ( $IS < 1$ ) cuando hay un importante cierre estomático. El cierre estomático que tiene lugar al mediodía es debido al efecto conjunto del incremento del déficit de presión de vapor y el bajo contenido de agua en el suelo (Chaves *et al.* 2002 [4]).

Al mismo tiempo que la contracción horaria de tronco en DI era mayor que en CTL, la pendiente de bajada de  $\Psi_{stem}$  también era mayor en DI. En cambio, cuando la contracción horaria era igual

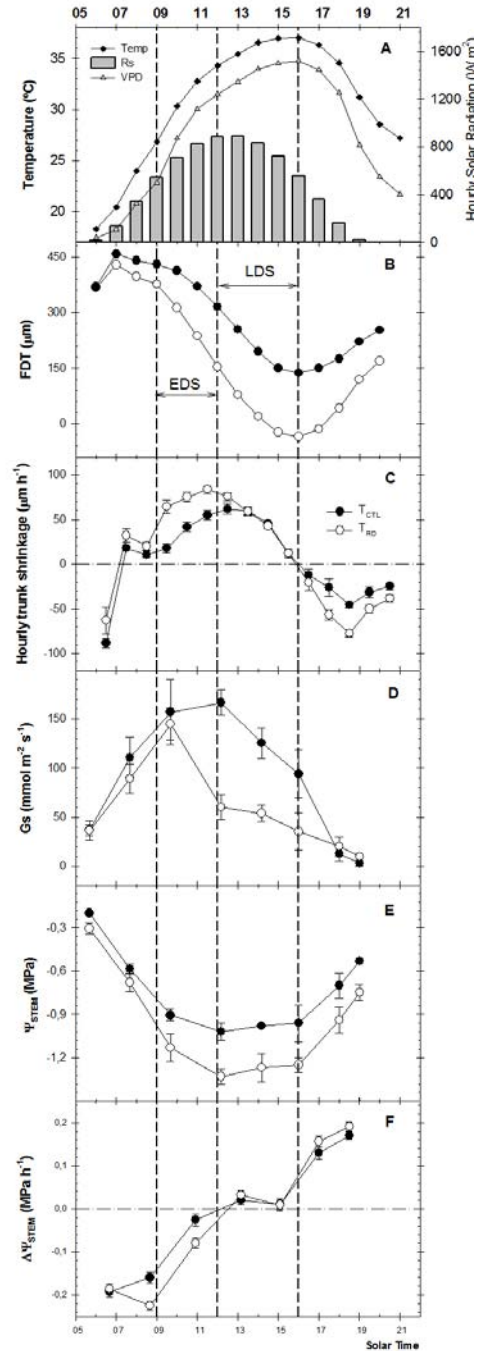
en ambos tratamientos, la pendiente de bajada de  $\Psi_{stem}$  también era igual en ambos tratamientos (figura 1).

(11.3 y 12.2), seguido de MDS (9.5 y 9.5) y de LDS (4.4 y 3.7).

**Tabla 3.** Intensidad de señal (IS), coeficiente de variación (CV) y relación entre IS y CV de las diferentes variables. Los datos muestran las medias de cada periodo. En 2009 el riego en DI fue un 40% menos que en CTL mientras que en 2010 la reducción de riego fue de 20, 30, 50 y 70% para los periodos 181-200, 201-230, 231-260 y 261-280, respectivamente. Las medidas utilizadas corresponden a días en los que se media  $\Psi_{stem}$  y de 6 sensores ó 6 medidas por tratamiento.

Año	Periodo	MDS	EDS	LDS	$\Psi_{STEM}$	
IS	2009	181-200	1.5	1.9	0.8	1.4
		201-230	1.7	2.3	0.9	1.6
		231-260	1.5	1.9	1.2	1.5
		261-280	1.0	1.2	0.9	1.2
		Promedio	1.5	1.9	1.0	1.4
IS	2010	181-200	1.3	1.4	1.1	1.0
		201-230	1.9	2.9	1.5	1.5
		231-260	1.9	2.0	1.2	1.5
		261-280	1.4	2.8	0.7	2.7
		Promedio	1.7	2.3	1.2	1.5
CV	2009	181-200	0.14	0.11	0.12	0.07
		201-230	0.16	0.15	0.20	0.07
		231-260	0.13	0.15	0.19	0.09
		261-280	0.20	0.25	0.35	0.08
		Promedio	0.16	0.17	0.22	0.08
CV	2010	181-200	0.29	0.28	0.49	0.18
		201-230	0.21	0.27	0.37	0.13
		231-260	0.11	0.10	0.25	0.09
		261-280	0.14	0.12	0.29	0.08
		Promedio	0.18	0.19	0.33	0.12
SI CV <sup>-1</sup>	2009	181-200	11.1	17.3	6.6	19.5
		201-230	10.9	15.8	4.5	23.9
		231-260	11.7	12.8	6.5	16.9
		261-280	5.2	4.7	2.5	14.9
		Promedio	9.5	11.3	4.4	19.0
SI CV <sup>-1</sup>	2010	181-200	4.5	5.1	2.3	5.6
		201-230	8.7	11.0	4.1	11.5
		231-260	16.4	20.8	4.7	16.7
		261-280	9.7	23.7	2.6	33.7
		Promedio	9.5	12.2	3.7	12.5

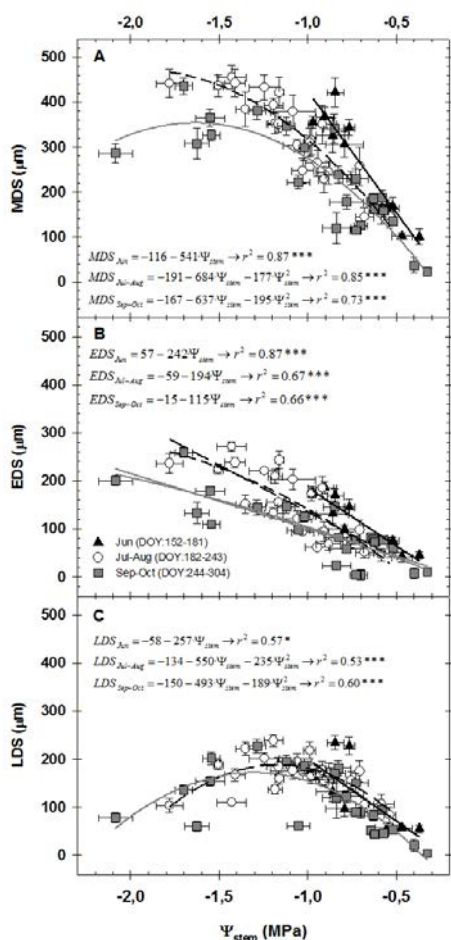
$\Psi_{stem}$  presentó los coeficientes de variación más bajos (0.08 y 0.12), seguido de MDS (0.16 y 0.18), EDS (0.17 y 0.19) y LDS (0.22 y 0.33).  $\Psi_{stem}$ , debido principalmente a sus bajos CV, fue el indicador más sensible al estrés hídrico, mostrando valores de sensibilidad de 19 y 12.5, para 2009 y 2010, respectivamente. Dentro de los indicadores derivados de las FDT, EDS fue claramente el que mayor sensibilidad presentó,



**Figura 1.** Evolución diaria de (A) temperatura (—◆—), déficit de presión de vapor (—▲—) y radiación solar (▒), (B) Fluctuación de diámetro de tronco, (C) Contracción horaria de tronco, (D) conductancia estomática, (E) potencial hídrico de tallo, (F) pendiente del potencial hídrico de tallo del día 26 August 2010 (DOY 238) para DI (—○—) y CTL (—●—). Los datos representados son medias ± ES de 6 medidas.

$\Psi_{stem}$  se correlacionó bien con diferentes parámetros derivados de las FDT. Los

coeficientes de determinación mejoraban cuando se consideraban tres periodos diferentes dentro de la poscosecha (Junio, Julio-Agosto y Septiembre-Octubre).  $\Psi_{stem}$  vs MDS presentó un diferente patrón de comportamiento conforme avanzaba la poscosecha de tal modo que a un mismo valor de  $\Psi_{stem}$  de -0.9 MPa le correspondían valores de MDS de 375 mm en Junio, 250 en Julio-Agosto y 225 en Septiembre-Octubre. MDS se relacionaba linealmente en Junio en el rango de -0.3 a -0.9 MPa. En los periodos Julio-Agosto y Septiembre-Octubre, el mejor ajuste era no lineal en los intervalos -0.6 a -1.8 MPa y -0.3 a -2.1 MPa, respectivamente (Figura 2).



**Figura 2.** Relación entre  $\Psi_{stem}$  and (A) máxima contracción de tronco (MDS), (B) Contracción temprana de tronco (EDS) y (C) contracción tardía de tronco (LDS) para diferentes periodos de poscosecha: Junio ( $\blacktriangle$ ), Julio-Agosto ( $\circ$ ) y septiembre-Octubre ( $\square$ ). Cada punto corresponde al promedio diario de 6 sensores y medidas por tratamiento. Se representa el error estándar bidireccional.

En cambio, EDS se relacionó linealmente, aunque la pendiente también decrecía

conforme avanzaba el periodo. Esta disminución de la pendiente conforme avanza el periodo puede ser debida a la pérdida de elasticidad de los tejidos del tronco (Intrigliolo and Castel 2004 [5]). LDS estaba relacionado con  $\Psi_{stem}$  mediante curvas más pronunciadas que las de MDS. En este caso las curvas no diferirían entre periodos.

#### 4. Conclusiones

EDS ha presentado alta sensibilidad al déficit hídrico incluso en condiciones de estrés severo, mejorando por tanto el comportamiento de MDS. Además, la cualidad de ser fácilmente automatizable hacen de este nuevo indicador una herramienta prometedora para la programación del riego en el futuro. Sin embargo son necesarios nuevos trabajos para testar el comportamiento de este indicador en otros cultivos.

#### 5. Agradecimientos

Este trabajo ha sido subvencionado por el ministerio español de ciencia e innovación (AGL2010-19201-C04-04), por el proyecto europeo SIRRIMED (FP7-KBBE-2009-3-245159) y por la Región de Murcia (08845/PI/08).

#### 6. Referencias bibliográficas

[1] Goldhamer, D.A., Fereres, E., 2001. Irrigation scheduling protocols using continuously recorded trunk diameter measurements. *Irrig Sci.* 20, 115-125.

[2] De la Rosa JM, Conesa MR, Domingo R, Torres R, Pérez-Pastor A (2013) Feasibility of using trunk diameter fluctuation and stem water potential reference lines for irrigation scheduling of early nectarine trees. *Agric Water Manage* 126: 133-141.

[3] Ortuño MF, Conejero W, Moreno F, Moriana A, Intrigliolo DS, Biel C, Mellisho CD, Pérez-Pastor A, Domingo R, Ruiz-Sánchez MC, Casadesus J, Bonany J, Torrecillas A (2010) Could trunk diameter sensors be used in woody crops for irrigation scheduling? A review of current knowledge and future perspectives. *Agr Water Manag* 97: 1-11.

[4] Chaves MM, Pereira JS, Maroco J, Rodrigues ML, Ricardo CPP, Osório ML, Carvalho I, Faria T, Pinheiro C (2002) How Plants Cope with water stress in the field. *Photosynth growth. Annals of Botany* 89: 907-916.

[5] Intrigliolo DS, Castel JR (2004) Continuous measurement of plant and soil water status for irrigation scheduling in plum. *Irrig Sci* 23 (2): 93-102.

## Resistencias cruzadas de poblaciones seleccionadas a ciantraniliprol y spiromesifén frente a otros insecticidas en *Bemisia tabaci* Gennadius

C. Grávalos, E. Fernández, I. Moreno, A. Belando, P. Bielza

Departamento de Producción Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena (Murcia), España. carolina.gravalos@upct.es

### RESUMEN

La mosca blanca *Bemisia tabaci* Gennadius es una plaga grave en muchos cultivos de campo y de invernadero en todo el mundo, y ha desarrollado resistencia a la mayoría de grupos químicos insecticidas. La facilidad con que esta plaga desarrolla resistencia hace imprescindible incorporar nuevos compuestos con diferentes modos de acción y sin resistencia cruzada con los utilizados anteriormente en las estrategias de manejo de la resistencia a insecticidas (MRI). Se ha probado el ciantraniliprol, que es una nueva materia activa aún sin registrar en España y el spiromesifén, un insecticida registrado hace pocos años. Nuestro trabajo se centra en el estudio de las resistencias cruzadas entre poblaciones de biotipo Q seleccionadas para la resistencia a estos nuevos insecticidas, con los materias activas más comúnmente utilizadas para el control de *B. tabaci* en el sureste español. Hasta el momento, los datos obtenidos de las poblaciones de *B. tabaci* resistentes a ciantraniliprol y spiromesifén no indicaron ninguna resistencia cruzada entre ellos y el resto de insecticidas bioensayados, presentando valores de CL50 similares al resto de poblaciones.

**Palabras clave:** Cyazypyr; Oberón; mosca blanca; biotipo Q; diamidas.

### 1. Introducción

La mosca blanca *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) es una plaga muy importante a nivel mundial, que afecta tanto a cultivos al aire libre como en invernadero. Provoca graves daños por su acción directa (picaduras, excreción de melaza,...), pero sin duda los más relevantes son los indirectos, ya que actúa como vector de multitud de virus como el TYLCV (*Tomato Yellow Leaf Curl Begomovirus*) o de la hoja en cuchara del tomate, y el ToLCNDV (*Tomato Leaf Curl New Delhi Virus*) o virus del rizado del tomate Nueva Delhi [1], que afecta a cucurbitáceas y solanáceas, con una muy fuerte incidencia desde el verano de 2013 en el sureste español.

El uso de insecticidas ha sido la principal estrategia para el control de *B. tabaci*, sobre todo en cultivos sensibles a virus, donde se aplica una gran cantidad de tratamientos específicos contra la mosca blanca. Debido a esta alta presión insecticida, esta plaga ha desarrollado de moderada a muy alta resistencia a la mayoría de los grupos insecticidas, incluidos los hidrocarburos clorados, organofosforados,

carbamatos, piretroides, reguladores del crecimiento y neonicotinoides [3-6].

La facilidad con que esta plaga desarrolla resistencias hace necesario el desarrollo de nuevos compuestos con diferentes modos de acción y sin resistencias cruzadas con los utilizados anteriormente para ser incorporados en las estrategias de manejo de la resistencia a insecticidas (MRI) con el fin de mantener bajo control las poblaciones de mosca blanca. Para ello, 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 y después estudiar las resistencias cruzadas entre cada uno de ellos.

Las poblaciones de *B. tabaci* del sureste español (Almería y Murcia) se han descrito en varias ocasiones como resistentes a diferentes insecticidas [7], y entre ellas se encuentran algunas de las poblaciones más resistentes jamás descritas [4]. Por ello esta zona, al ser el peor caso posible, es un lugar ideal para estudiar las resistencias cruzadas. Por otra parte, debido a marcadas diferencias en la susceptibilidad de insecticidas entre biotipos de mosca blanca, y el

hecho de que el biotipo Q ha sido citado como el más resistente, es importante probar la toxicidad de estas materias activas con poblaciones de campo de este biotipo.

El conocimiento de la susceptibilidad basal y la existencia de resistencias cruzadas entre insecticidas, es esencial para el desarrollo racional de las estrategias de manejo anti-resistencia.

El objetivo de este trabajo es estudiar las resistencias cruzadas que presentan dos poblaciones de *B. tabaci* seleccionadas en laboratorio para la resistencia a ciantraniliprol y spiromesifén, cuando se bioensayan con los insecticidas más comúnmente utilizados para el control de mosca blanca en el sureste español.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Poblaciones

Para llevar a cabo los objetivos de este trabajo se han utilizado dos poblaciones de laboratorio, R-CYA y R-SPI, seleccionadas para la resistencia a ciantraniliprol y spiromesifén respectivamente y la población sensible de referencia S-LAB

### 2.2 Insecticidas

Para obtener las poblaciones resistentes se han utilizado ciantraniliprol (Cyazypyr 20 SC; Verimark™, DuPont Crop Protection, Newark, DE) y spiromesifén (Oberón 24 SC, Bayer CropScience) y en los bioensayos para determinar las resistencias cruzadas: alfacipermetrín (Fastac 10 EC, BASF), azadiractín (Aling 3,2 EC, Sipcarn Iberia), imidacloprid (Confidor 20 LS, Bayer CropScience), pimetozina (Plenum 50 WG, Syngenta Agro), piridabén (Sanmite 20WP, BASF), y piriproxifén (Juvinal 10 EC, Kenogard). En todos los casos, en el momento de hacer el bioensayo se preparan diluciones de los insecticidas en agua destilada a la que se le añade el mojante Tween 20.

### 2.3 Bioensayo de huevos

El piriproxifén es un insecticida ovicida, así que siempre que se utiliza hay que realizar un bioensayo de huevos. Para ello se utilizan plántulas de algodón de unos 20 o 25 cm de altura, con unas 4 hojas verdaderas. A una de ellas se le fija una caja-pinza, con unas 40 hembras adultas en su interior durante 24 horas para la oviposición, Fig. 1a. Transcurrido este periodo de tiempo, se quitan los adultos de la hoja, y se marcan 30 huevos en cada una de ellas Fig. 1b.

Se preparan 5 dosis y el control, todas ellas con agua destilada y mojante (Tween 20) en proporción 1:1000, y se procede al tratamiento. Éste se lleva a cabo introduciendo la hoja con los huevos durante 10 segundos en la dosis correspondiente, Fig. 1c, y dejándola secar al aire.

Transcurridos 14 días del comienzo del ensayo se procede al conteo de la mortalidad, considerando individuos vivos aquellos que se encuentran en estado N2, Fig. 1d y muertos tanto los huevos muertos como aquellos que a pesar de tener buen aspecto aún no han eclosionado Fig. 1e, debido a que ha pasado el tiempo suficiente para su desarrollo.

### 2.4 Bioensayo de ninfas

Los ensayos de ninfas son similares a los de huevos, sólo se diferencian en los periodos de tiempo. También se utilizan plántulas de algodón en las que se fijan cajas-pinza, con unas 40 hembras adultas cada una y en este caso, la oviposición dura 48 horas.

Terminado el periodo de oviposición en las plántulas, se eliminan los adultos de cada hoja y se mantienen en condiciones de laboratorio durante 12 días para que se desarrollen los huevos.

Una vez alcanzado el estadio N2, se marcan 30 ninfas y se procede al tratamiento, que al igual que en el bioensayo de huevos, se lleva a cabo introduciendo por completo la hoja con las ninfas durante 10 segundos en la dosis correspondiente y dejándola secar al aire.

Pasados 15 días desde el tratamiento (tiempo necesario para que en nuestras condiciones de laboratorio todos los huevos lleguen al menos a estado de pupa) llega el momento del conteo de la mortalidad, donde se consideran como individuos vivos aquellos que se han desarrollado hasta llegar a estado de pupa, Fig. 1g, y también los exuvios (el adulto ya ha emergido). Por otro lado, se consideran muertos los huevos no eclosionados, y tanto las ninfas muertas (Fig. 1f) como aquellas ninfas que a pesar de tener buen aspecto aún no han llegado a estado de pupa.

### 2.5 Análisis estadístico

Siempre que fue necesario, las mortalidades obtenidas en los bioensayos se corrigieron teniendo en cuenta la mortalidad del control [8]. Los datos se analizan mediante un análisis Probit, utilizando el programa PoloPlus [9].

Para determinar las diferencias significativas entre poblaciones, se calcula la concentración que causa una mortalidad del 50%, a la que se

denomina concentración letal 50 (CL50) y los límites de confianza al 95% (LC 95%) para cada una de ellas.

También se ha calculado el FR (factor de resistencia a nivel de CL50), que es la relación entre la CL50 de cada una de las poblaciones y la CL50 de la población sensible de referencia.

### 3. Resultados y Discusión

En la Tabla 1 se exponen los valores de CL50 obtenidos para las poblaciones R-CYA y R-SPI cuando se bioensayaron con el insecticida para el que habían sido seleccionadas y con el contrario, para determinar el nivel de resistencia adquirido y la existencia o no de resistencia cruzada entre ellas, respectivamente, y los factores de resistencia obtenidos. Como puede verse, en ambos casos se ha alcanzado un nivel suficiente de resistencia. En el caso de R-SPI con una CL50 de 17,13 mg/L, que comparado con 1,08 mg/L que es el resultado obtenido para la población sensible de referencia (S-LAB), supone un FR de 16, o lo que es lo mismo, es 16 veces más resistente al insecticida que la población sensible. Si observamos lo que sucede al bioensayarla con ciantraniliprol, podemos ver que no muestra diferencias significativas respecto de S-LAB, lo que puede traducirse como ausencia de resistencia cruzada entre ambos insecticidas. Lo mismo ocurre para la población R-CYA, la CL50 obtenida para ciantraniliprol es 0,799 mg/L, unas 20 veces mayor que el valor obtenido por la población sensible (0,039 mg/L).

Las Tablas 3 muestra los valores de CL50 y FR obtenidos al bioensayar las poblaciones seleccionadas con los insecticidas comúnmente utilizados para el control de *B. tabaci* en el sureste español. Ambas tablas se encuentran incompletas puesto que los ensayos están en curso o aún por comenzar. Los resultados obtenidos hasta el momento muestran como en la mayoría de los casos no aparecen diferencias significativas respecto de S-LAB. Sólo al ensayar R-SPI con piridabén aparecen diferencias significativas respecto de la sensible, aunque los valores son tan próximos que no parece un dato muy destacable. Sin embargo, sí que parece muy interesante lo que ocurre al ensayar esta misma población con piriproxifén, puesto que resulta significativamente más sensible que la población S-LAB. Estamos a la espera de terminar el resto de bioensayos para hacer más pruebas y confirmar esta resistencia cruzada negativa, que significaría que al aumentar la

resistencia a spiromesifén disminuye la resistencia a piriproxifén.

Ambas poblaciones se comportan igual que la población sensible frente a imidacloprid.

### 4. Conclusiones

Basándonos en los resultados obtenidos para las poblaciones seleccionadas, otros previos que muestran una ligera variación en la tolerancia a spiromesifén [4] y otros aún en proceso de publicación que muestran que poblaciones de campo resistentes a diferentes grupos insecticidas fueron tan susceptibles a ciantraniliprol como la población sensible de referencia [10], consideramos que ciantraniliprol y spiromesifén pueden desempeñar un papel importante en las estrategias de manejo de resistencia a insecticidas en *B. tabaci* debido a su alta eficacia y a la ausencia de resistencias cruzadas con otros insecticidas.

Aun así, teniendo en cuenta la facilidad de *B. tabaci* a desarrollar resistencia a diferentes materias activas, se recomienda supervisar el uso de estos nuevos productos para mantener su eficacia durante el mayor tiempo posible.

### 5. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2011-25164), fondos FEDER y DuPont.

### 6. Referencias bibliográficas

- [1] BORM 2014. Orden Consejería de Agricultura y Agua 1779/2014, de 7 de febrero, por la que se declara la existencia de la plaga virus del rizado del tomate Nueva Delhi (*Tomato Leaf Curl New Delhi Virus. ToLCNDV*) y se dictan medidas fitosanitarias obligatorias para combatir al virus y a sus insectos vectores. BORM 36 (7 febrero 2014): 5841-5843.
- [2] Horowitz A.R., Kontsedalov S., Khasdan V., Ishaaya I. 2005. Biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* and their relevance to neonicotinoid and pyriproxyfen resistance. Arch Insect Biochem Physiol 58: 216-225.
- [3] Palumbo J.C., Horowitz A.R., Prabhaker N. 2001. Insecticidal control and resistance management for *Bemisia tabaci*. Crop Prot 20: 739-765.
- [4] Fernández E., Grávalos C., Haro P.J., Cifuentes D., Bielza P. 2009. Insecticide resistance status of *Bemisia tabaci* Q-biotype in

south-eastern Spain. *Pest Manag Sci* 65: 885-891.

[5] Nauen R., Denholm I. 2005. Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: current status and future prospects. *Arch Insect Biochem Physiol* 58 : 200-215.

[6] Nauen R., Bielza P., Denholm I., Gorman K. 2008. Age-specific expression of resistance to neonicotinoid insecticides in the whitefly, *Bemisia tabaci*. *Pest Manag Sci* 64: 1106-1110.

[7] Elbert A., Nauen R. 2000. Resistance of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides in southern Spain with special reference to neonicotinoids. *Pest Manag Sci* 56: 60-64.

[8] Abbott W.S. 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 18: 265-267.

[9] 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.

[10] Grávalos C., Fernández E., Belando A., Moreno I., Bielza P. 2014. Cross-resistance and baseline susceptibility of Mediterranean Straits of *Bemisia tabaci* to cyantraniliprole. Pendiente de publicación.

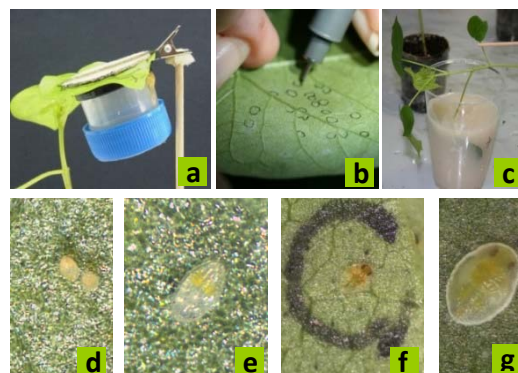


Figura 1. Bioensayo de *Bemisia tabaci*

### Tablas y Figuras

**Tabla 1.** Susceptibilidad y factores de resistencia a ciantraniliprol y spiromesifén de ninfas de *B. tabaci*. Expresado como CL50 (mg/L) (LC 95%)

	S-LAB	R-SPI	FR	R-CYA	FR
CYA	0,039 (0,034-0,057)	0,030 (0,008-0,043)	1	0,80 * (0,47-1,82)	* 20
SPI	1,08 (0,60-1,81)	17,13 * (7,76-26,8)	* 16	0,54 (0,31-0,80)	0,5

**Tabla 2.** Susceptibilidad y factores de resistencia a los insecticidas usados habitualmente para el control de *B. tabaci*. Expresado como CL50 (mg/L) (LC 95%)

	S-LAB	R-SPI	FR	R-CYA	FR
ALFA	141,19 (40,29-255,59)				
AZA	2,65 (0,53-6,55)				
IMI	15,19 (1,29-81,08)	15,07 (7,78-25,69)	1	6,50 (2,90-10,84)	0,4
PIM	29,17 (3,17-107,38)				
PIB	0,34 (0,21-0,51)	1,98 * (0,96-4,64)	* 6		
PIX	20,86 (13,77-30,37)	3,98 * (1,12-6,87)	* 0,2		

## Estudio de lixiviación de nitratos en suelos de invernaderos de pimiento biosolarizados

P. Fernández<sup>(1)</sup>, J.A. Pascual<sup>(2)</sup>, A. Lacasa<sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> Oficina Comarcal Agraria Vega Alta (OCA). Consejería de Agricultura y Agua. Ctra de Murcia s/n. 30.530 Cieza (Murcia). pedro.fernandez5@carm.es

<sup>(2)</sup> Departamento de Suelo, Agua y Manejo de Residuos orgánicos. CEBAS-CSIC. Campus Universitario de Espinardo. 30100 Murcia.

<sup>(3)</sup> Departamento de Biotecnología y Protección de Cultivos. IMIDA. C/ Mayor s/n 30150 La Alberca (Murcia).

### RESUMEN

La biosolarización del suelo en invernaderos de pimiento (*Capsicum annuum* L.) supone una estrategia de control de enfermedades telúricas (*Phytophthora capsici* y/o *parasítica* y *Meloidogyne incognita*), de vegetación adventicia y de fenómenos de fatiga muy adecuada para mantener buenos niveles productivos en sistemas de monocultivo prolongado. Este trabajo pretende evaluar las repercusiones de la aplicación de cantidades importantes de materia orgánica, hasta 100 t/ha, en estos agrosistemas sobre la calidad del suelo y en el medio ambiente. El ensayo de lixiviación de nitratos en condiciones controladas se realizó sobre columnas de suelo inalterado los cuales habían sido sometidos a biosolarización de primer año (100 t/ha de enmiendas) comparándose con el efecto sobre un suelo de referencia tratado con bromuro de metilo (BM) en la dosis de 30 g/m<sup>2</sup> + plástico VIF, sin la aplicación de enmiendas orgánicas. El contenido en agua lixiviada en las muestras biosolarizadas fue de 5,3 L/columna, mientras que la columna desinfectada con bromuro de metilo lixivió 9,9 litros, de un total de 29,7 litros aplicados en ambos casos. El total de nitrato lixiviado para cada uno de los tratamientos fue de 10,0 g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/columna para el tratamiento con la enmienda y 25,7 g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/columna para el tratamiento con ausencia de enmiendas orgánicas. La actividad biológica medida en el suelo biosolarizado fue superior a la del suelo tratado con BM, sobre todo en los dos primeros perfiles de la columna (hasta 20 cm de profundidad).

**Palabras clave:** *Capsicum annuum*; materia orgánica; bromuro de metilo; actividad biológica; actividades enzimáticas.

### INTRODUCCIÓN

El pimiento es un monocultivo en más del 90% de los invernaderos del Campo de Cartagena (Murcia) y del sur de la provincia de Alicante [6], siendo *Phytophthora* spp. (*capsici* y *parasítica*) el principal patógeno fúngico del cultivo [10,18]. La presencia de estos hongos, la de *Meloidogyne incognita* y el efecto de la fatiga del suelo, generada por la reiteración del cultivo en el mismo suelo, había motivado que todos los invernaderos se desinfecten anualmente con bromuro de metilo (98:2 a 60 g/m<sup>2</sup> sellado con plástico de polietileno de 0,05mm) desde 1985 [7] hasta 2005 [4], en que el bromuro de metilo quedó autorizado en forma de usos críticos para una parte de la superficie, dejándose de utilizar en 2007.

La biosolarización se ha propuesto como una técnica eficaz de desinfección de suelos frente a

patógenos telúricos, siendo utilizable en agricultura ecológica. Sin embargo, la aplicación de importantes cantidades de materia orgánica y su reiteración en el tiempo plantea la necesidad de abordar el estudio de aspectos fundamentales sobre el suelo y su impacto sobre el medioambiente. Entre ellos, una de las serias dudas existentes ante la bondad de la biosolarización en cuanto a desinfección de suelos, es el potencial riesgo de lixiviación de nitratos y el posible aporte de metales pesados [11].

La lixiviación de nutrientes en sistemas de fertirrigación localizada está directamente relacionada con el movimiento de cada nutriente en el volumen de suelo humedecido por los goteros, donde se desarrollan las raíces de las plantas. Los nutrientes presentan una distribución tridimensional, dependiendo del movimiento de cada nutriente dentro del bulbo,



de diversos factores entre los que cobran especial interés las propiedades físicas y físico-químicas del suelo, dosis y fórmula del fertilizante, volumen de riego y caudal de descarga del gotero, influyendo directamente el desarrollo y distribución de raíces en el suelo según régimen de riego y posición de goteros.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo de lixiviación de nitratos en condiciones controladas se realizó sobre columnas de suelo inalterado sometido a biosolarización de primer año con una dosis de enmienda de 100 t/ha (70 t/ha estiércol de ovino y 30 t/ha de gallinaza), siempre comparándose con el efecto sobre un suelo control tratado con bromuro de metilo en la dosis de 30 g/m<sup>2</sup> + plástico VIF (filmes virtualmente impermeables), sin la aplicación de enmiendas, que era el método habitual de desinfección de los suelos. El suelo del invernadero experimental es representativo de los suelos medios de cultivo de pimiento en el Campo de Cartagena de textura fina y niveles medios de materia orgánica (Tabla 1). Se procedió a la toma de tres replicas de cada tratamiento, mediante sondeo de suelo inalterado en cilindros de 80 cm de largo y 30 cm de ancho. En el perfil de la columna se procedió a la colocación de diferentes sondas de succión a distintas profundidades, una superficial y otras 3 cada 10 cm de profundidad, tipificadas como

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evolución del volumen de lixiviados a lo largo del ensayo fue variable, presentando valores superiores en el tratamiento con bromuro de metilo en comparación con el biosolarizado (Fig. 1). La dinámica del agua en las diferentes columnas fue distinta, presentando las biosolarizadas una tasa de infiltración superior, al menos en los perfiles superiores, en la línea de lo obtenido por [2, 10] en lisímetros con cultivo de pimiento bajo invernadero, donde los primeros 25 cm de profundidad la densidad aparente disminuye frente al mismo suelo sin biosolarizar. El hecho de que los suelos con BM lixiviaran más cantidad puede deberse a la mayor capacidad de retención hídrica que presentan los suelos estercolados, lo que se manifiesta en una mayor retención de agua, disminuyendo la lixiviación de ésta [5]. El nitrato lixiviado a lo largo del ensayo también fue superior en los suelos no enmendados, tal y

El objetivo del trabajo fue medir, en condiciones controladas, a partir de columnas de suelo inalterado, la lixiviación de nitratos y los principales parámetros biológicos en suelos biosolarizados en comparación con suelos desinfectados con bromuro de metilo (BM), que no incluían la aportación de enmiendas.

perfiles S, V, Y y Z. Durante el cultivo, se evaluó el volumen de drenaje y de nitrato.

En cada una de las columnas se plantó una planta de pimiento cv. 'Requena' la cual fue fertirrigada con la misma disolución con la que se riega el cultivo en los invernaderos de la comarca del Campo de Cartagena, de modo que en todo momento los resultados obtenidos a escala de laboratorio pudiesen ser extrapolables a suelos naturales. En cada riego se midió la cantidad de disolución suministrada y la concentración de lixiviado obtenido en un periodo de tiempo determinado, a través de un ICP (Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo). Para determinar posibles variaciones en la producción de biomasa se pesaron todas las recolecciones de frutos y al final del ensayo se pesó la planta entera. En cada uno de los muestreos se midió peso fresco, peso seco (medido en estufa a 65°C hasta peso constante) y nitrógeno. Al finalizar el ensayo se analizó el suelo en cada uno de los perfiles de la columna [9].

como muestran [1] en columnas de suelo esterilizado frente a suelos naturales (Fig. 1). El volumen total lixiviado en las muestras de suelo biosolarizado fue de 5,3 ± 0,5 L, mientras que el suelo bromurado lixivió 9,9 ± 0,7 L, de un total de 29,7 litros aplicados en ambos casos. Las cantidades totales lixiviadas fue de 10,0 ± 1,2 g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/columna para el tratamiento con estiércol y 25,7 ± 3,0 g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/columna para el tratamiento con ausencia de enmendantes orgánicos, resultados similares a los obtenidos por [10] en lisímetros con cultivos de pimiento bajo invernadero, donde después de la aplicación de hasta 100 t/ha de estiércoles y año presentaron tasas de lixiviación inferiores a los suelos que no recibieron cantidad alguna. La concentración de nitratos también fue muy variable a lo largo del periodo de muestreo presentando unos valores máximos de 5,8 y 10,6 g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L, para columnas biosolarizadas y no biosolarizadas,

respectivamente, lo que quiere decirse que durante el transcurso de la disolución por la columna ocurren fenómenos de adsorción/desorción en *feedback*, condicionada por la elevada actividad biológica y enzimática, sobre todo ureasa [3]. [1] justifica la menor lixiviación de formas recalcitrantes del nitrógeno, especialmente de elevado peso molecular, en columnas a la inmovilización microbiana. Esta mayor retención del nitrógeno en la columna podría permitir a la planta un mayor aprovechamiento del mismo, pudiendo permitir el reducir las aplicaciones nitrogenadas y, además, en caso de realizarse, el riesgo de lixiviación es significativamente menor en cuanto a concentración de nitratos [8].

La producción de frutos, en peso fresco, fue de  $219,1 \pm 21,8$  y  $188,0 \pm 45,6$  g/planta para los suelos biosolarizados y bromurados, respectivamente. El peso fresco del total de biomasa desechada, incluyendo frutos, hojas y resto de planta, no presentó diferencias significativas entre tratamientos con valores de producción de  $625,7 \pm 38,2$  en las columnas con enmiendas y de  $572,1 \pm 55,5$  g/total biomasa, para el tratamiento con bromuro de metilo sin adición de materia orgánica. En cada uno de los órganos vegetativos muestreados se analizó el nitrógeno, no encontrando diferencias significativas entre tratamientos, tanto en hojas como frutos (Fig. 2). El análisis de la planta, a partir de tallo y ramas, presentó, para la tesis biosolarizada, un valor de nitrógeno de  $2,89 \pm 0,12\%$ , y  $2,63 \pm 0,12\%$ , para la bromurada.

## REFERENCIAS

- [1] Abaas, E.; Hill, P.W.; Roberts, P.; Murphy, D.V.; Jones, D.L. 2012. Microbial activity differentially regulates the vertical mobility of nitrogen compounds in soil. *Soil Biology & Biochemistry*. Volumen: 53, pp: 120-123.
- [2] Fernández P.; Guirao P.; Ros, C.; Guerrero, M.M.; Quinto V.; Lacasa, A. 2004. Efecto de la biofumigación con solarización sobre las características físicas y químicas del suelo. Desinfección de suelos en invernaderos de pimiento. Publicaciones de la Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. Región de Murcia, 259-277.
- [3] Fernández, P.; Pascual, J.A. y Lacasa, A. 2014. Potencial de lixiviación de nitratos de la técnica de biosolarización en suelos de invernaderos de pimiento. En prensa.
- [4] Guerrero, M.M., Lacasa, C.M., Ros, C., Martínez, V., Fenoll, J., Torres, J., Beltrán, C., Fernández, P., Bello, A., Lacasa, A. 2009. Pellets de brasicas como enmiendas para biosolarización de invernaderos de pimiento. *Actas de Horticultura*, 54, 424:429.
- [5] Herai Y, Kouno K, Hashimoto M, Nagaoka T. 2006: Relationships between microbial biomass nitrogen, nitrate leaching and nitrogen uptake by corn in a compost and chemical fertilizer-amended regosol. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 52, 186–194.
- [6] Lacasa, A.; Guirao, P. 1997. Investigaciones actuales sobre alternativas al uso del bromuro de metilo en pimiento en invernaderos del Campo de Cartagena. En “Posibilidad de alternativas viables al bromuro de metilo en pimiento en invernadero”. Publicación de la Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua. Región de Murcia. Jornadas 11: 21-36.
- [7] Lacasa, A.; Guirao, P.; Guerrero, M.M., Ros, C., López, J.A., Bello, A., Bielza, P. 1999. Alternatives to methyl bromide for sweet pepper cultivation in plastic green houses in South-east Spain. In “Alternatives to Methyl Bromide for the Southern European Countries. Heraklion. Creta. Grecia 7-10 december. Proceedings: 133-135.
- [8] Ma, L.R., Malone W, Jaynes D. B., Thorp, K. R., Ahuja K. R. 2008. Simulated Effects of Nitrogen Management and Soil Microbes on Soil Nitrogen Balance and Crop Production *Soil Sci. Soc. Am. J.*, September 30, 2008; 72(6): 1594 - 1603.
- [9] MAPA, 1994. Métodos oficiales de análisis de suelos y aguas para riego. In Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Ed). *Métodos Oficiales de Análisis*. Vol. III.
- [10] Rincón, L.; Pérez, A.; Abadía, A.; Sáez, J.; Pellicer, C. 2005. Fertirrigación localizada en un cultivo de pimiento grueso de invernadero en producción integrada. II Lixiviación de nutrientes. *Agrícola Vergel*, 75-79 pp.
- [11] Ros, M., García, C., Hernandez, M.T., Lacasa, A., Fernández, P., Pascual, J.A. 2008. Effects of biosolarization as methyl bromide alternative for *Meloidogyne incognita* control on quality of soil under pepper. *Biol Fertil Soils*.

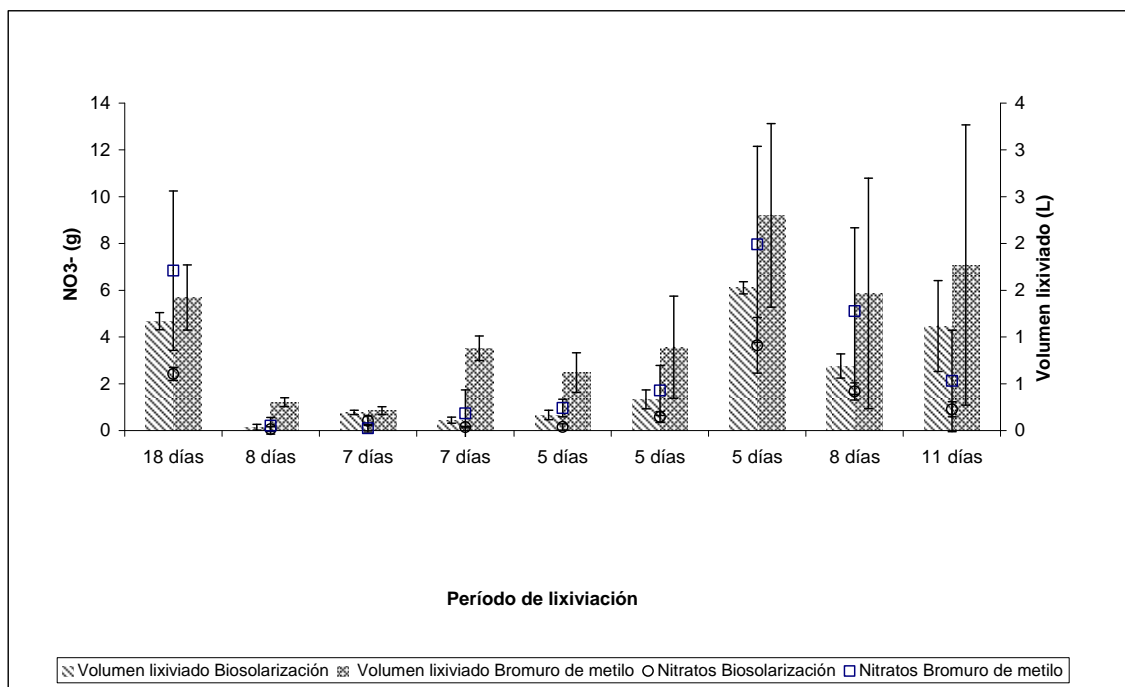
**Tablas y Figuras**

**Tabla 1.** Características del suelo al final del ensayo en cada uno de los perfiles de la columna. Media±error estándar

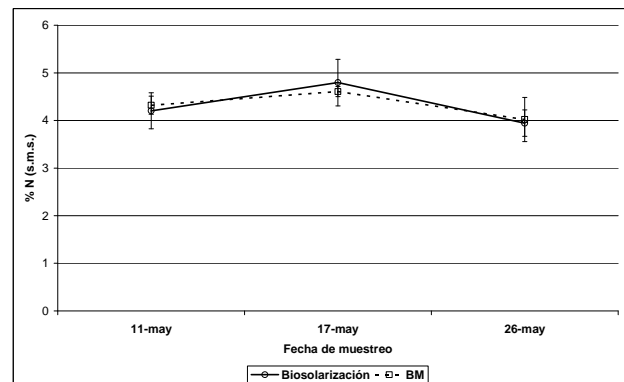
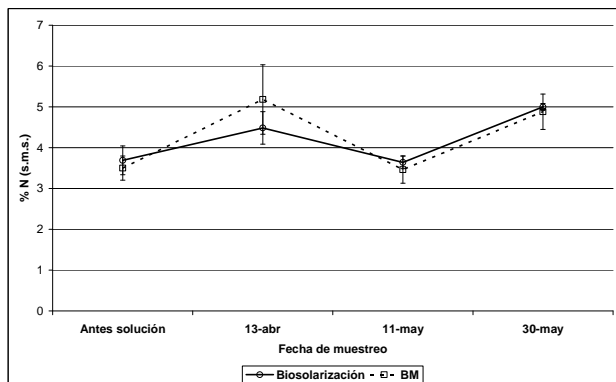
Parámetro	Bio S <sup>(1)</sup>	Bio V	Bio Y	Bio Z	BM S <sup>(2)</sup>	BM V	BM Y	BM Z
pH	8,00±0,02	8,24±0,07	8,29±0,10	8,47±0,20	8,18±0,25	8,22±0,07	8,08±0,06	8,05±0,05
C.E. (dS/m)	0,81±0,29	0,57±0,27	0,86±0,14	0,74±0,33	0,58±0,25	0,69±0,26	0,855±0,12	0,93±0,16
N (Kjeldahl) (%)	0,26±0,08	0,27±0,02	0,19±0,05	0,19±0,07	0,25±0,05	0,23±0,04	0,21±0,06	0,17±0,08
Nitratos (mg/Kg)	251,6±18,9	188,4±80,2	152,3±39,3	106,27±66,0	220,7±51,7	154,7±96,2	145,9±70,0	122,7±9,9
Amonio (mg/Kg)	4,40±1,90	3,60±0,40	3,60±0,29	4,47±1,95	3,50±0,33	4,87±0,55	5,10±2,12	3,80±1,13
C orgánico (%)	3,35±0,40	2,95±0,49	2,09±0,52	1,72±0,04	2,51±0,12	2,52±0,36	2,34±0,64	1,54±0,26

<sup>(1)</sup> Bio S= Perfil S de la columna biosolarizada

<sup>(2)</sup> BM S= Perfil S de la columna tratada con bromuro de metilo



**Figura 1.** Medida del volumen medio de lixiviación y de nitratos por periodo de toma de muestra en la columna de suelo inalterada. Media ± error estándar



(a)

(b)

**Figura 2.** Evolución de la concentración de nitrógeno en hoja (a) y frutos (b). Media ± error estándar

## Variabilidad de la tolerancia a la alimentación sin presa en distintas poblaciones mediterráneas de *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae)

J. E. Mendoza, V. Balanza, M. J. Sánchez-Martínez, P. Bielza

Departamento de Producción Vegetal, ETSIA. Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, España. enrique.menriv@gmail.com.

### RESUMEN

La capacidad de *Orius laevigatus* para alimentarse de polen le permite sobrevivir en condiciones de escasez de presas, prolongando su durabilidad en el cultivo. Sin embargo, su potencial reproductivo se ve muy afectado, por lo que sería interesante poder obtener individuos capaces de multiplicarse de manera efectiva en esas condiciones. En esa línea de trabajo, se estudió la variabilidad de ocho poblaciones mediterráneas en cuanto a su fecundidad alimentándose sólo de polen; así como la tolerancia de dichas poblaciones a tales condiciones adversas, calculada como el porcentaje respecto de la fecundidad del control, alimentado con huevos de *Ephestia kuehniella*. En todas las poblaciones la fecundidad disminuyó considerablemente cuando se alimentó a los adultos con polen (reducción media del 73,3%). Aunque no se encontraron diferencias significativas entre poblaciones al analizar la fecundidad en el polen, éstas sí que existían cuando el factor evaluado era la tolerancia a la alimentación sin presa. La población más tolerante resultó ser La Zenia, en la que se registró una fecundidad diaria media de casi el 44% respecto del control, mientras que entre las más sensibles fueron las recolectadas en Portonovo y Hellín, en las que la fecundidad osciló en torno al 19% respecto del control. Este estudio supone el inicio de un proceso de selección con el fin de obtener una población tolerante a la alimentación sin presa, lo que será fundamental a la hora de adelantar la introducción de *O. laevigatus* en el cultivo.

**Palabras clave:** antocóridos; fecundidad diaria media; *Ephestia*; polen.

### 1. Introducción

El uso de enemigos naturales para combatir a las plagas se está convirtiendo en una práctica cada vez más habitual. Entre los más usados en la actualidad, gracias a su efectividad en un gran número de ecosistemas agrarios, se encuentra el chinche *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae), un voraz depredador polífago muy común en la cuenca Mediterránea y el norte de Europa (Péricart, 1972).

En los últimos años, la atención sobre *O. laevigatus* como agente de control biológico ha aumentado notablemente, sobre todo a partir de que empezara a considerarse como el principal enemigo de *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae), una de las plagas que mayores daños económicos provoca en cultivos de invernadero de todo el mundo [2-5], en los que se establece este chinche y donde logra un éxito similar al control químico [6-7].

Como resultado de este especial interés, muchas compañías fitosanitarias han intensificado la producción masiva de estos insectos (datos no

publ.) y, del mismo modo, cada vez más trabajos se centran en la búsqueda de la metodología y la dieta más rentables para la cría de este insecto en condiciones controladas [8-10].

Sin embargo, cuando los agricultores realizan la suelta de enemigos naturales en el invernadero, se encuentran con que su efectivo poblacional se ve muy afectado cuando el número de presas disminuye. En el caso de *Orius*, a pesar de que en numerosos estudios se ha informado acerca de su capacidad para sobrevivir alimentándose del polen de las flores del cultivo, también es cierto que si lo hacen exclusivamente de este modo su fecundidad se ve muy reducida [11-12].

A pesar de ello, poder alimentarse de polen se considera una gran estrategia adaptativa para sustentar a las poblaciones de estos insectos en condiciones de escasez [13-14]. Es por eso que mejorar la fecundidad de *O. laevigatus* podría permitir su liberación en el cultivo cuando la plaga aún no se hubiera extendido. En esa línea de trabajo, se estudió la variabilidad de ciertas poblaciones mediterráneas de *O. laevigatus* a la tolerancia a la alimentación sin presa, con el

objeto de evaluar, más tarde, la respuesta a la selección de dicho carácter.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Recolección y cría de *Orius laevigatus*.

El material biológico utilizado en este estudio se obtuvo de la cría artificial de *O. laevigatus* a partir de poblaciones silvestres recolectadas en distintas localidades de clima mediterráneo. El mantenimiento y la posterior multiplicación se llevaron a cabo en recipientes de plástico de un litro en los que se introdujeron los individuos junto con un vial de agua de 10 mL sellado con algodón hidrófilo como fuente de hidratación, una judía como sustrato de puesta, huevos de *Ephestia kuehniella* como alimento y cáscara de trigo como refugio para evitar el canibalismo.

Las poblaciones objeto de estudio en el actual trabajo fueron Moreira, Portonovo (ambas en Pontevedra), Cuevas de Almanzora (Almería), Ruidera (Ciudad Real), La Zenia (Alicante) y Hellín (Albacete), además de una población comercial y una población mezcla de todas las anteriores, con una mayor variabilidad genética.

### 2.2 Métodos de bioensayo.

Para la realización de los bioensayos, se partió de adultos recién emergidos de cada población ensayada (máx. 24 horas desde la emergencia), formando dos grupos de unos 50-60 individuos que fueron introducidos en sendos recipientes con las mismas condiciones que en la cría pero con una diferencia fundamental en cuanto a la alimentación: mientras que a los individuos del control se les alimentó con huevos de *Ephestia*, el tratamiento diferencial consistió en una mezcla comercial de polen de varias plantas.

Tras un periodo de tiempo de 3-5 días durante el cual tendría lugar la cópula, los individuos fueron sexados, individualizando entre 10 y 20 hembras para estudiar la diferencia de fecundidad tanto entre tratamientos como entre poblaciones. Para ello se usaron pequeños recipientes de polipropileno de 45 mL con tapa ajustable en las que a cada hembra se le proporcionó un trozo de judía con los extremos sellados con parafina como sustrato de puesta y fuente de hidratación, así como huevos de *Ephestia* o polen como alimento en función del tratamiento.

Todos los bioensayos se realizaron en cámaras climáticas a  $26 \pm 1$  °C y fotoperiodo 16:8 (L:O).

### 2.3 Lectura y toma de datos.

Cada 2-3 días se cambió la judía a las hembras aisladas, anotando el número de huevos puestos

durante ese tiempo. Este proceso se repitió a lo largo de dos semanas, tiempo durante el cual las judías con huevos del tratamiento diferencial se mantenían a baja temperatura, a la espera de que se eligiera la descendencia de las hembras con mayor fecundidad respecto del control.

### 2.3 Tratamiento estadístico.

Los bioensayos se realizaron completamente al azar, con dos tratamientos por cada población y un total de 10 a 20 réplicas por tratamiento ( $n=10-20$ ). Mediante un test de correlación se evaluó la interacción entre los tratamientos.

Transformadas las medias de tolerancia a la alimentación sin presa, y confirmados los criterios normalidad y homocedasticidad tanto para éstas como para las medias de fecundidad, se realizó un ANOVA para cada parámetro en función de la población. Cuando se observaron diferencias significativas entre las poblaciones, se separaron sus medias mediante un test de comparaciones múltiples. Todos los test se evaluaron al 95% de confianza ( $p < 0,05$ ) [15-16].

## 3. Resultados y Discusión

El análisis de regresión lineal constató que no existe relación alguna entre la fecundidad diaria media (FDM) de los dos tratamientos ensayados ( $F=0,187$ ; g.l.=1;  $r=0,040$ ;  $P=0.666$ ).

Como ya se había observado [17], todas las poblaciones de *O. laevigatus* eran capaces de poner huevos independientemente de la dieta. Sin embargo, en la Figura 1 podemos ver cómo la FDM desciende considerablemente en todas las poblaciones al alimentarlas exclusivamente con polen ( $t= 16,274$ ; g.l.= 116;  $P < 0,001$ ). De hecho, el valor medio de FDM fue de 6,73 huevos por hembra y día en el control, frente a los 1,8 huevos del tratamiento con polen, lo que supone una reducción del 73,25%. Estos resultados van en consonancia con los de Cocuzza et al. [17], quienes observaron una reducción superior al 60% en la fecundidad de una población comercial alimentada con polen.

Por otro lado, en la Tabla 1 se muestran los resultados para las tres variables evaluadas en función de la población: FDM en el control, FDM con dieta basada en polen y tolerancia a la alimentación sin presa.

En primer lugar, aunque existen diferencias entre las distintas poblaciones en cuanto a su FDM en el control ( $F= 6,503$ ; g.l.= 7;  $P < 0,001= 0,000$ ), éstas pueden considerarse dentro del rango de variabilidad natural de la especie. A pesar de ello,

se distingue una población de elevada FDM, Portonovo, así como otra con una baja FDM, Moreira, existiendo entre ambas una diferencia media de 5,37 huevos por hembra y día.

En el tratamiento diferencial, por su parte, no se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones ( $F=1,662$ ; g.l.= 7;  $P= 0,126$ ).

Sin embargo, al analizar los resultados de tolerancia a la alimentación sin presa, parámetro calculado en este trabajo como el porcentaje de la FDM en el tratamiento con polen respecto de la FDM registrada en el control, sí que se observaron diferencias significativas entre las poblaciones ( $F= 5,045$ ; g.l.= 7;  $P<0,001$ ). Así pues, entre las poblaciones ensayadas nos encontramos con La Zenia, que presenta una elevada tolerancia a la alimentación con polen, ya que su FDM casi alcanza el 50% de la del control. Esta población resultó ser, precisamente, una de las menos fecundas en el control, lo que podría deberse al coste ecológico provocado por un posible proceso de adaptación para hacer frente a un ambiente que se aleje del rango tolerancia de la especie. En el extremo opuesto se encuentra la población de Portonovo, en las que la FDM en el tratamiento diferencial fue del 19% respecto del control. En la misma línea que lo expuesto anteriormente, se podría hacer referencia a una situación más estable en el área de la que procede esta población, de manera que las condiciones del tratamiento diferencial al que aquí ha sido expuesta habrían supuesto una fuerte presión sobre su plasticidad fenotípica.

Las observaciones en este y otros estudios revelan que la supervivencia y la reproducción de *O. laevigatus* en ausencia de presas están principalmente supeditadas a su capacidad para alimentarse a base de polen, aún a expensas de una reducción en la fecundidad. Este aspecto es clave a la hora del manejo en campo de este insecto, ya que permite realizar la suelta cuando la plaga aún no se ha extendido en el cultivo, aumentando su eficacia en el control de ésta.

En cuanto a las poblaciones aquí estudiadas, es interesante señalar que la que mejor beneficio ofrecería para la cría masiva en biofábricas, en las que el alimento se suministra *ad libitum*, son las recolectadas en Portonovo o Hellín, ya que poseen una elevada fecundidad en condiciones óptimas. Pero si lo que se desea es adelantar su introducción en el cultivo, la más conveniente sería la de La Zenia ya que, aunque presenta una menor capacidad reproductiva, su rendimiento es más alto cuando se alimenta sólo con polen, en comparación con otras poblaciones.

No obstante, la extrapolación al campo de los resultados aquí expuestos debe hacerse con precaución, ya que el potencial reproductivo de *Orius* en condiciones de laboratorio puede ser muy distinto al que presente en el invernadero.

#### 4. Conclusiones

A pesar de que no se han encontrado diferencias entre las poblaciones ensayadas en cuanto a la fecundidad cuando las hembras se alimentan de polen, éstas si son significativas si se comparan con las del control, alimentadas con huevos de *Ephestia*. Este estudio permitirá estudiar, *a posteriori*, la respuesta a la selección de la tolerancia a la alimentación sin presas en *Orius*, dando lugar, con el tiempo, a individuos con una elevada eficacia reproductiva a pesar de que se adelante su liberación en el cultivo.

#### 5. Agradecimientos

Los autores se muestran agradecidos a M. Garre y E. Martínez-Díaz por su inestimable ayuda técnica.

#### 6. Referencias bibliográficas

- [1] Péricart, J. 1972. Hémiptères. Anthocoridae, Cimicidae et Microphysidae de l'Ouest-Paléartique. Masson et Cie. Paris. 402 pp.
- [2] van den Meiracker, R. A. F., Ramakers, P. M. J. 1991. Biological control of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, in sweet pepper, with the anthocorid predator *Orius insidiosus*. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent 56 (2a): 241-249.
- [3] 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.
- [4] van de Veire, M., Degheele, D. 1997. Predatory bugs and control of thrips. Agric. 289: 7-9.
- [5] Urbaneja, A., Arán, E., León, P., Gallego, A. 2003. Efecto combinado de altas temperaturas y de humedades en la supervivencia, fecundidad y fertilidad de *Orius laevigatus* y *Orius albidipenis* (Hemiptera: Anthocoridae). Bol. San. Veg. Plagas 29: 27-34.
- [6] Santonicola, L. y Milone, M. 1998. Experiments in the control of the thrips

*Frankliniella occidentalis* (Pergande) on sweet pepper. *Informatore Agrario* 54(8), 98-100.

[7] Vergara, L., Giacometti, R., Cupo, P. 2009. Integrated control in peppers: functional and advisable. *Informatore Agrario* 65(20), 53-58.

[8] Bueno, V. H. P., Mendes, S. M., Carvalho, L. V. 2006. Evaluation of a rearing-method for the predator *Orius insidiosus*. *Bull. Insect.* 59(1): 1-6.

[9] Bonte, M. y De Clercq, P. 2008. Developmental and reproductive fitness of *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae) reared on factitious and artificial diets. *J. Econ. Entomol.* 101: 1127–1133.

[10] Tan, X. L, Wang, S., Zhang, F. 2013. Optimization an optimal artificial diet for the predatory bug *Orius sauteri* (Hemiptera: Anthocoridae). *PLoS ONE* 8(4): e61129.

[11] Coll, M. 1996. Feeding and ovipositing on plants by an omnivorous insect predator. *Oecología* 105: 214-220.

[12] Bonte, M., De Clercq, P. 2010. Influence of diet on the predation rate of *Orius laevigatus* on *Frankliniella occidentalis*. *BioControl* 55: 625-629.

[13] **Pumariño, L.** y Alomar, O. 2012. The role of omnivory in the conservation of predators: *Orius majusculus* (Heteroptera: Anthocoridae) on sweet alyssum. *Biological Control* 62: 24-28.

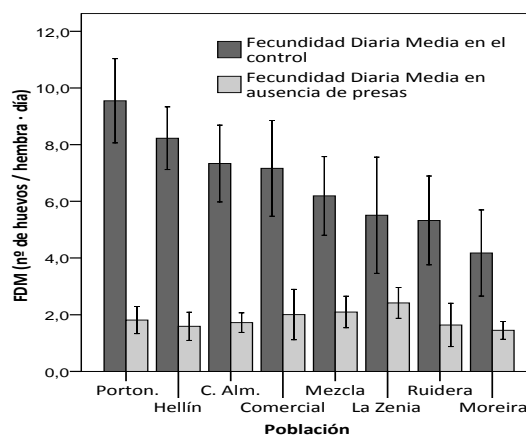
[14] Wong, S. K. and **Frank, S. D.** 2013. Pollen increases fitness and abundance of *Orius insidiosus* (Say) (Heteroptera: Anthocoridae) on banker plants. *Biological Control* 64: 45-50.

[15] Statacorp, 2005. *Stata statistical Software/Release 9.* StataCorp LP, College Station, TX, USA.

[16] Spss Inc., 2006. *Guide to data analysis, version 15.0.* Spss Inc. Chicago, IL, USA.

[17] Cocuzza, G.E., De Clercq, P., Lizzio, S., Van De Veire, M., Tirry, L., Degheele, D., and Vacan-te, V. 1996. Reproduction of *Orius laevigatus* and *Orius albidipennis* on pollen and *Ephestia kuehniella* eggs. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 82: 101-104.

### 7. Tablas y Figuras



**Fig. 1.** Fecundidad diaria media de las distintas poblaciones bioensayadas de *Orius laevigatus* para ambos tratamientos. Las barras de error hacen referencia al Índice de confianza al 95%.

**Tabla 1.** Diferencias en la Fecundidad Diaria Media de las distintas poblaciones de *Orius laevigatus* ensayadas en función de la dieta. Diferencias en la tolerancia a la alimentación sin presa (ANOVA).

Población	n <sup>a</sup>	FDM control <sup>b</sup>	FDM polen <sup>b</sup>	Tolerancia (%) <sup>c</sup>
<b>La Zenia</b>	13	5.51 ± 3.40 bc	2.42 ± 0.90 a	43.91 ± 16.25 a
<b>Mezcla</b>	12	6.19 ± 2.18 bc	2.10 ± 0.88 a	33.83 ± 14.13 ab
<b>Ruidera</b>	12	5.33 ± 2.47 bc	1.64 ± 1.21 a	30.80 ± 22.65 ab
<b>Comercial</b>	10	7.17 ± 2.36 abc	2.00 ± 1.24 a	27.95 ± 17.35 ab
<b>Moreira</b>	18	4.18 ± 3.06 c	1.45 ± 0.63 a	24.35 ± 10.57 b
<b>Cuevas de Almazora</b>	18	7.33 ± 2.73 ab	1.72 ± 0.69 a	23.52 ± 9.42 b
<b>Hellín</b>	20	8.23 ± 2.37 ab	1.59 ± 1.06 a	19.30 ± 12.85 b
<b>Portonovo</b>	14	9.55 ± 2.58 a	1.81 ± 0.83 a	19.00 ± 8.69 b

Las medias ± SE de cada columna seguidas por la misma letra no son significativamente distintas, p > 0.05, Test de Tukey.

<sup>a</sup> n: número de hembras ensayadas para cada tratamiento, una vez corregidos los valores perdidos.

<sup>b</sup> FDM: Fecundidad Diaria Media, expresada en número de huevos puestos por cada hembra al día.

<sup>c</sup> Tolerancia a la alimentación sin presa (%) = FDM polen · 100 / FDM control.

## Ciclo de vida de *Allium chrysonemum* y efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la floración

E. Martínez-Díaz, J.J Martínez-Sánchez, F. J. Segura, M. Aguado, S. Bañón, M. J. Vicente

Departamento de Producción Vegetal, Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena. 30203 Cartagena, España. ely.martinez@hotmail.com

### RESUMEN

*Allium chrysonemum* es una especie endémica del sudeste ibérico catalogada como vulnerable en el Catálogo Regional de Flora Silvestre Protegida de la Región de Murcia. Se ha estudiado el desarrollo y fenología de los bulbos procedentes de Calasparra obtenidos de semilla y la influencia de la temperatura de almacenaje sobre la emergencia del escapo floral, aspectos importantes para hacer reintroducciones en campo. Se estudió el desarrollo morfofenológico de los bulbos durante 2009-2012. Los bulbos extraídos en 2011 se almacenaron a 5°C, 10°C y 22°C. Los resultados muestran un lógico incremento de peso de los bulbos con los años. Ya en el segundo ciclo de cultivo se inició la floración de algunos bulbos (16%), dándose una floración plena durante el tercer ciclo (99%). En este tercer ciclo de cultivo el 10% de los bulbos forman bulbillos, de los cuales el 37,5% desarrolló a su vez el escapo floral. En cuanto al efecto de la temperatura de almacenamiento de los bulbos, el 100% de los conservados a 22°C brotaron durante el almacenamiento, mientras que a 5°C y a 10°C lo hicieron el 70% y 81% respectivamente. La conservación a bajas temperaturas provocó una disminución gradual en el tiempo de emergencia del escapo floral. Por otro lado, los bulbos almacenados a bajas temperaturas florecieron con tan sólo 4 hojas, mientras que los conservados a 22°C lo hicieron con 6 hojas. El almacenamiento a bajas temperaturas ayuda a evitar floraciones tardías y por tanto disminuye el riesgo de fallo reproductivo en veranos muy secos.

**Palabras clave:** Crecimiento del bulbo; bajas temperaturas; escapo.

### 1. Introducción

El género *Allium* L. (Alliaceae) es uno de los géneros de mayor importancia económica que comprende cultivos tanto hortícolas, herbáceos como ornamentales, y numerosas especies silvestres [1]. Además, este género muestra una gran diversidad de especies que se diferencian en múltiples caracteres morfológicos, forma de vida (bulbos o rizomas) y tipo de hábitats. Entre las especies silvestres se encuentra *A. chrysonemum*, endémica del sudeste ibérico y catalogada como vulnerable en el Catálogo Regional de Flora Silvestre Protegida de la Región de Murcia (BORM 50/2003).

Las especies de plantas raras y amenazadas se consideran prioritarias en el ámbito de la conservación de la diversidad biológica a causa de su distribución geográfica restringida, su amplitud ecológica reducida y sus vulnerabilidades ante procesos de deriva genética, depresión por entrecruzamiento de parientes próximos y fenómenos ambientales

aleatorios. Según [2], hay una necesidad apremiante de mejorar el conocimiento de su biología, especialmente en las áreas de biología poblacional y reproductiva, genética y ecología, como paso inevitable para prevenir su extinción. Así mismo, los factores ambientales que más afectan al desarrollo del bulbo son el fotoperiodo, el frío del almacenaje y la temperatura de crecimiento, pero el efecto de éstos depende del estado fenológico de la planta [3]. En concreto la temperatura de almacenaje de los bulbos antes de la siembra afecta la velocidad de brotación del ajo, así como el vigor de crecimiento y la forma de la planta.

La información bibliográfica al respecto es muy escasa, por lo que se hace necesario llevar a cabo estudios que aborden este aspecto. Del mismo modo tampoco se encuentra información relativa a los aspectos morfológicos y fenológicos de esta especie, aspectos también de gran interés a la hora de obtener planta tanto para reintroducciones o reforzamiento de



poblaciones como para el desarrollo de cultivos de utilidad potencial.

Los objetivos de este estudio fueron conocer (a) el desarrollo de los bulbos obtenidos de semilla, así como la capacidad de floración y de bulbificación y (b) el efecto de las bajas temperaturas de almacenamiento sobre la emergencia del escape floral.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. Material vegetal

Las plantas de *Allium chrysonemum* pueden alcanzar hasta 60 cm de longitud con bulbos de 1,5 x 2,5 cm, ovoideos y con la túnica externa membranosa, presentando en ocasiones un bulbillo [4] (Castroviejo et al., 1993). Puede desarrollar 3-4 hojas, de hasta 15 cm de longitud, semicilíndricas, fistulosas, envainadoras, con vaina pelosa, y un indumento de pelos simples, de hasta 0,8 mm de longitud. La espata está formada por dos brácteas desiguales, persistentes, y la inflorescencia en umbela, de 4-6 cm de longitud, laxa, y las flores sin bulbillos. El fruto es una cápsula, de hasta 5 mm de longitud, globoso, con semillas de 4 x 2 mm. Esta especie forma parte de espartizales, lastonares, pedregales y litosuelos en claros de pinares y sabinares. Sus poblaciones se encuentran en las montañas subbéticas andaluzas, sierras del sur de Albacete y noroeste de Murcia (Moratalla, Calasparra y Caravaca).

### 2.2. Seguimiento del desarrollo y fenología de los bulbos procedentes de semilla

Este ensayo se llevó a cabo durante un período de cuatro años en la Finca Experimental Agroalimentaria “Tomás Ferro” de la Universidad Politécnica de Cartagena. Las semillas de *A. chrysonemum* utilizadas en este ensayo procedían de la población localizada en Calasparra. Un lote de semillas de la especie fue sembrado el 10 de noviembre de 2009 en bandejas forestales de 60 alveólos (1 semilla por alveólo), rellenas con una mezcla de turba y suelo en la proporción 1:1. El cultivo se desarrolló en un umbráculo de malla negra, sobre mesas con riego por aspersión. El 2 de junio de 2010 se extrajeron los bulbos y se almacenaron en ambiente seco a 19°C hasta que fueron plantados el 27 de septiembre de 2010. Las condiciones de cultivo fueron las mismas excepto la mezcla de sustrato, utilizándose fibra de coco y vermiculita en la proporción 7:3. Justo antes de la plantación, todos los bulbos se pesaron utilizando una balanza de precisión (0,0001 mg). Durante todo el ciclo de cultivo se realizaron controles de emergencia, desarrollo

vegetativo, floración y bulbificación. A finales de julio de 2011, cuando las hojas estaban totalmente secas, se volvieron a extraer los bulbos y antes de ser almacenados se procedió a su caracterización morfológica (peso y diámetros longitudinal y transversal). El 29 de septiembre de 2011 se llevó a cabo la siembra de los bulbos, en las condiciones anteriormente mencionadas, y se realizaron los controles oportunos de emergencia, desarrollo vegetativo, floración y bulbificación. A finales de julio de 2012 se extrajeron nuevamente para caracterizarlos morfológicamente.

### 2.3. Efecto de las bajas temperaturas de almacenamiento sobre la emergencia del escape floral

Los bulbos extraídos al final del tercer ciclo (2011/2012) se clasificaron en 3 tamaños; grandes, medianos y pequeños y se almacenaron a las temperaturas de 5°C, 10°C y 22°C desde julio a septiembre.

### 2.4. Análisis estadístico

Un análisis multivariante de la varianza se utilizó para evaluar la influencia sobre la germinación de las condiciones utilizadas en cada ensayo. Los datos fueron analizados con el programa estadístico SPSS 19.0 para Windows (SPSS Inc., Chicaco, EE.UU.). La normalidad y homocedasticidad de los datos fueron verificados. Cuando los efectos principales eran significativos, las diferencias fueron probados por la prueba de comparación múltiple de Tukey a  $P < 0,05$ .

## 3. Resultados y Discusión

Según los resultados obtenidos en el peso y diámetros (Tabla 1), podemos observar un incremento significativo de peso de los bulbos durante los tres periodos de cultivo llegando a aumentar hasta un 85% más, sin existir diferencias significativas entre bulbos bulbificados y no bulbificados en el último año. Hay un aumento significativo respecto al diámetro longitudinal siendo los más largos los bulbos que han bulbificado con un valor de unos 20 mm. Igualmente el diámetro transversal va a aumentando durante los ciclos pero en el último año son los bulbos no bulbificados más anchos (15,6mm) que los bulbificados (14,8mm) sin diferencias significativas entre ambos. Los mayores porcentajes obtenidos de bulbos florecidos y de bulbos bulbificados (Tabla 2) fueron a la temperatura de almacenamiento

más cálida así como solamente florecieron el 23% de los bulbillos a esta temperatura.

Los tratamientos a bajas temperaturas de 5 y 10°C durante el almacenamiento provocan una emergencia anticipada del escapo floral (Fig.1) a los 152 y 157 días después del trasplante con respecto al tratamiento de 22°C que emerge a los 195 días. En la Figura 2 se muestra que los bulbos a bajas temperaturas tienen el mismo número de hojas (4) en el momento de la floración con respecto a la temperatura más cálida (6 hojas). Las altas temperaturas de almacenamiento (Fig.3) favorecieron el incremento de peso, de manera significativa, en un 4,42 g con respecto al 2,80 g conseguido a bajas temperaturas.

La floración se inicia en el segundo ciclo de cultivo (2010/2011) con un 16% de bulbos florecidos y es en el tercer ciclo donde se da una floración plena (99%) y además el 10% forma bulbillos de los cuales el 37,5% desarrolló el escapo floral (Fig.4).

#### 4. Conclusiones

Para conseguir floración en el primer año de introducción de la especie en campo es aconsejable la utilización de bulbillos frente a la siembra de semillas.

El almacenamiento de los bulbos a bajas temperaturas ayuda a evitar floraciones tardías y por tanto disminuye el riesgo de fallo reproductivo en veranos muy secos.

#### 5. Agradecimientos

Agradecer la estimable ayuda técnica ofrecida por mis compañeras y amigas Naveira, D. y Rosique, M. A así como a Solano, F.J.

#### 6. Referencias bibliográficas

- [1] Ricoch, A., Yockteng, R., Brown, S.C., Nadot, S. 2005. Evolution of genome size across some cultivated *Allium* species. *Genome*. 48: 511-520.
- [2] Falk, D.A., Millar, C.I., Olwell, M. 1996. *Restoring Diversity*. Island Press, New York.
- [3] Takagi A. & T. Aoba. J. Yamagata. 1975. *Agric. For. Soc.* 32.
- [4] Castroviejo, S., Aedo, C., Cirujano, S., Lainz, M., Monserrat, P. Moscales, R. Muñoz Garmendia, F., Navarro, C. Paiva, J., Soriano, C. 1993. *Flora Ibérica* vol. 20. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.

#### Tablas y Figuras

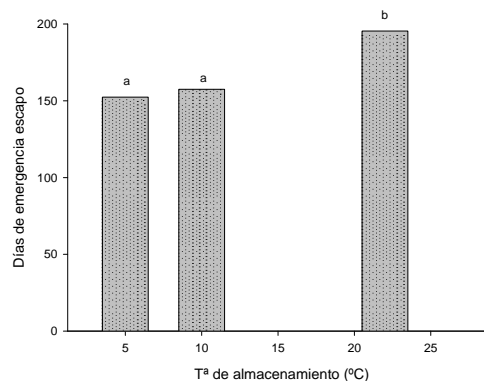
**Tabla 1.** Pesos y Ø de *A.chrysonemum* de 2009-2012

	2009/10	2010/11	2011/12	
			No bulb.	Bulb.
Peso(g)	0,394a	1,064b	2,626c	2,173c
Ølong(mm)		14,835a	17,662ab	20,24b
Øtrans(mm)		10,707a	15,582b	14,85b

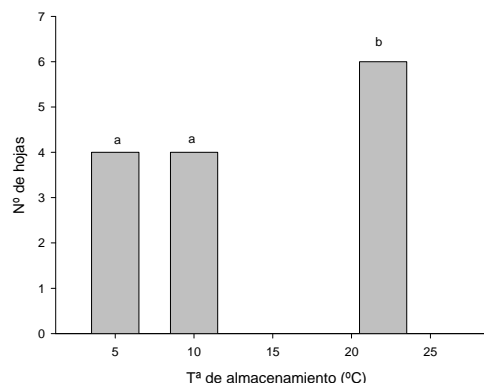
Letras diferentes para valores dentro de una fila indican una diferencia significativa (Test Tukey; p<0,05)

**Tabla 2.** % de floración de los bulbos (BF), de bulbificación (BB) y de bulbillos florecidos (BBF)

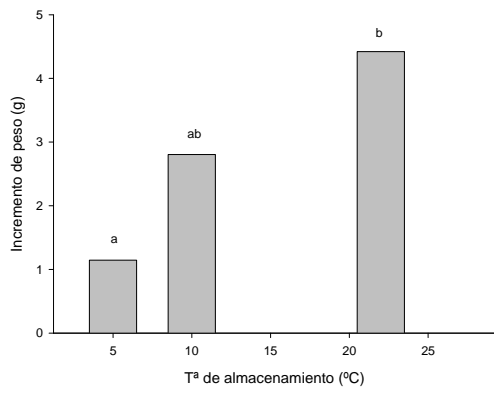
	5°C	10°C	22°C
BF	81,25	76,92	86,36
BB	43,75	23,08	63,64
BBF	0	0	22,73



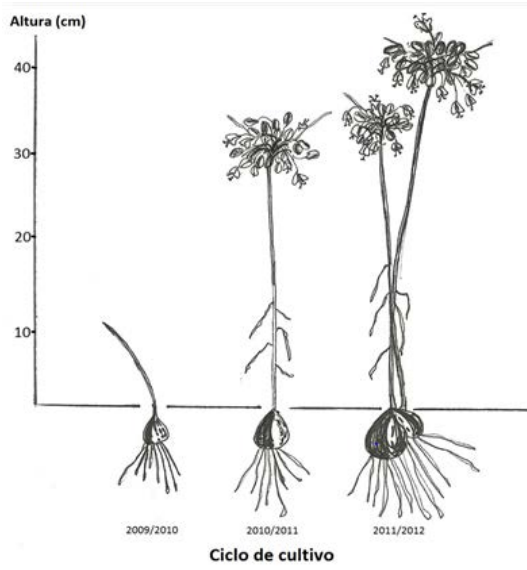
**Figura 1.** Días de emergencia del escapo floral de los bulbos almacenados a distintas temperaturas



**Figura 2.** Nº hojas en el momento de la emergencia del escapo floral de los bulbos almacenados a distintas temperaturas



**Figura 3.** Incremento de peso de los bulbos almacenados a distintas temperaturas



**Figura 4.** Ciclo de vida de *A. chrysonemum*

## Plant water status indicators for detecting water stress in pomegranate trees

A. Galindo<sup>(1)</sup>, P. Rodríguez<sup>(2)</sup>, S. Ondoño<sup>(1)</sup>, J. Collado-González<sup>(1)</sup>, A. Moriana<sup>(3)</sup>, Z.N. Cruz<sup>(2)</sup>, F. Moreno<sup>(4)</sup>, A. Torrecillas<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CSIC). Apartado 164, 30100 Espinardo (Murcia). España. agalindo@cebas.csic.es

<sup>(2)</sup> Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Ctra. de Tapaste, km 3.5. San José de Las Lajas, Mayabeque, Cuba.

<sup>(3)</sup> Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica. Universidad de Sevilla, Carretera de Utrera, km 1, E-41013 Sevilla, España.

<sup>(4)</sup> Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología (CSIC), P.O. Box 1052, E-41080 Sevilla, España.

### SUMMARY

Measurements obtained by the continuous monitoring of trunk diameter fluctuations were compared with discrete measurements of midday stem water potential ( $\Psi_{\text{stem}}$ ) and midday leaf conductance ( $g_i$ ) in adult pomegranate trees (*Punica granatum* (L.) cv. Mollar de Elche). Control plants (T0) were irrigated daily above their crop water requirements in order to attain non-limiting soil water conditions, while T1 plants were subjected to water stress by depriving them of irrigation water for 34 days, after which time irrigation was restored and plant recovery was studied for 7 days. T1 plants showed a substantial degree of water stress, which developed slowly. Maximum daily trunk shrinkage (MDS) was identified to be the most suitable plant-based indicator for irrigation scheduling in adult pomegranate trees, because its signal:noise ((T1/T0):coefficient of variation) ratio was higher than that for  $\Psi_{\text{stem}}$  ((T1/T0):coefficient of variation) and  $g_i$  ((T0/T1):coefficient of variation). MDS increased in response to water stress, but when the  $\Psi_{\text{stem}}$  fell below  $-1.67$  MPa, the MDS values decreased.

**Key words:** Plant water relations; *Punica granatum*; trunk diameter fluctuations

### 1. Introduction

Pomegranate (*Punica granatum* L.) is a very interesting fruit tree species because it has drought resistant characteristics [1], being able to thrive well in arid and semiarid areas, even under desert conditions [2]. However, to reach optimal growth, yield and fruit quality, pomegranate trees require regular irrigation, particularly during the dry season [3].

The use of plant-based water status indicators has become very popular for planning precise irrigation, because plant water status may be the ideal method for predicting crop performance under a given irrigation scheduling regime. Since plant water status controls many physiological processes and crop productivity, this information can be highly useful in irrigation scheduling [4]. Measurements of trunk diameter fluctuations (TDF) using trunk diameter sensors provide continuous and automated recording of maximum daily trunk shrinkage (MDS), which has been shown to be

suitable for the development of automated irrigation scheduling in fruit trees [5].

In this study, the sensitivity of MDS in comparison with other discretely measured indicators of plant water status in response to a cycle of water deprivation and recovery was studied.

### 2. Materials and Methods

#### 2.1. Plant material, experimental conditions and treatments

The experiment was carried out in 2009 on a farm located near the city of Murcia (Spain) (37°57' N, 0°56'W). The plant material consisted of own rooted 10-year old pomegranate trees (*Punica granatum* L.) cv. Mollar de Elche, with an average trunk diameter of about 15 cm. Tree spacing followed a 3 m × 6 m pattern, with an average ground cover of about 59 %.

The soil of the orchard was a weakly saline Xeric Torriorthent, with silt loam texture. The

irrigation water had an electrical conductivity of between 1.7 and 2.2 dS m<sup>-1</sup> and the Cl<sup>-</sup> concentration in the irrigation water ranged from 36 to 48 mg l<sup>-1</sup>.

Control plants (treatment T0) were irrigated above crop water requirements (115 % ETo), using six emitters (each delivering 4 l h<sup>-1</sup>) per plant. Irrigation in T1 plants was withheld for 34 days (from day of the year (DOY) 209 to 243, second half of rapid fruit growth period). The recovery of plants was ensured by re-irrigation at the levels used in T0 for 6 days (from DOY 244 to 250). Total water amounts applied in the experimental period were 261 and 38 mm for T0 and T1 treatments, respectively.

During the experiment pest control and fertilization practices were those usually used by local growers, and no weeds were allowed to develop within the orchard. Irrigation was carried out daily and during the night using a drip irrigation system with one lateral pipe per tree row.

## 2.2 Measurements

Meteorological data were collected by automatic weather stations located near the experimental sites. Mean daily air vapour pressure deficit (VPD<sub>m</sub>) and daily crop reference evapotranspiration (ETo) were calculated according to Allen et al. [6].

Midday (12 h solar time) stem water potential ( $\Psi_{\text{stem}}$ ) was measured on the south facing side and the middle third of the trees, in two fully developed leaves per tree of each replicate, enclosing leaves in small black plastic bags covered with aluminium foil for at least 2 h before measurements in the pressure chamber (model 3005, Soil Moisture Equipment Co., Santa Barbara, CA, USA). Midday leaf conductance (g<sub>l</sub>) in attached leaves was measured with a steady-state porometer (LI-1600, LICOR Inc., Lincoln, USA) on the abaxial surface of the leaves and in a similar number and type of leaves as used for the  $\Psi_{\text{stem}}$  measurements

The micrometric trunk diameter fluctuations (TDF) were measured throughout the experimental periods in four trees per treatment, using a set of linear variable displacement transducers (LVDT) as indicated by Moriana et al. [5]. MDS was calculated as the difference between the daily maximum diameter and the minimum diameter.

To compare the sensitivity of the plant-based indicators for use as water stress indicators it is more suitable to compare their values relative

to those of the control trees. For this, the signal intensity of both continuous and discrete plant water status measurements were defined as the relative values (T1/T0 or T0/T1), while variability or noise was defined as the coefficient of variation of the mean. Thus, the signal:noise ratio integrates both the indicator strength and its variability, and is important for assessing the usefulness of plant-based water stress indicators for irrigation scheduling.

## 2.3 Statistical analysis

The design of the experiment was completely randomized with four replications. Data were analyzed using SPSS software [7]. Analysis of variance was performed and means values were compared by an LSD<sub>0.05</sub> test. Values for each replicate were averaged before the mean and the standard error of each treatment were calculated.

## 3. Results and Discussion

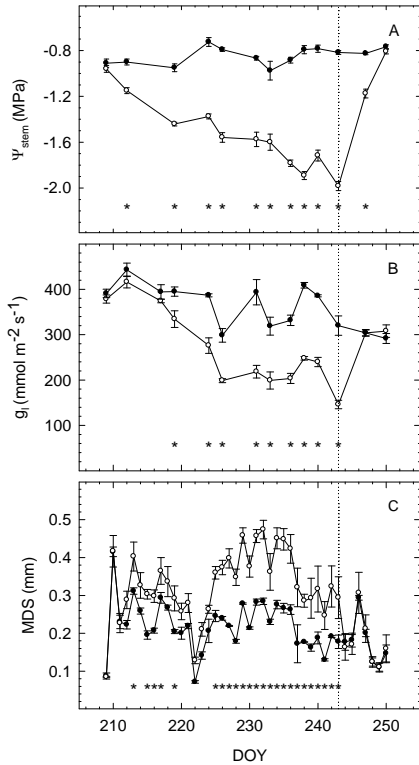
During the experimental period, average daily maximum and minimum air temperatures were 32.5 and 20.2 °C, respectively. VPD<sub>m</sub> ranged from 0.98 to 2.84 kPa, and accumulated ETo was 226 mm. There was no rainfall during the experimental period.

The high  $\Psi_{\text{stem}}$  and g<sub>l</sub> values in T0 plants throughout both experimental periods (Figure 1A and B) suggested that control pomegranate plants were under non-limiting soil water conditions. Despite that T1 plants at the end of the water withholding period pointed to a relatively strong water stress situation, the decrease in  $\Psi_{\text{stem}}$  values at a rate of around 0.025 MPa d<sup>-1</sup> indicates that the water stress developed quite slowly (Figure 1A and B).

MDS values showed substantial fluctuations during the experimental period (Figure 1C). Differences between T0 and T1 treatments were evident as early as four days after the imposition of water stress, due to the MDS increase in T1 plants (Figure 1C). When T1 plants were rewatered, MDS values fell and were similar in both treatments during the recovery period.

The fact that MDS signal:noise ratio was higher than that for  $\Psi_{\text{stem}}$  and g<sub>l</sub> for all the intervals of time considered (Table 1) suggested that MDS is the most suitable indicator for pomegranate irrigation scheduling. In this sense, Ortuño et al. [8] showed that continuously measured plant water status indicators were more immediate and sensitive than discretely measured indicators. Moreover, Remorini and Massai [9]

indicated that trunk diameter fluctuations differed between irrigation treatments even in the absence of differences in  $\Psi_{stem}$ , and Goldhamer et al. [10] indicated that MDS responded sooner than  $\Psi_{stem}$  to water stress.



**Figure 1.** Midday stem water potential ( $\Psi_{stem}$ ) (A), midday leaf conductance ( $g_i$ ) (B) and maximum daily trunk shrinkage (MDS) (C) in T0 (closed symbols) and T1 (open symbols) plants during the 2009 experimental period. Bars on data points are  $\pm$  S.E. of the mean (not shown when smaller than symbols). Vertical dotted line indicated the time at which irrigation was restored. Asterisks indicate statistically significant differences by least significant difference at 5% level ( $LSD_{0.05}$ ) range test. Each point is the mean of four values

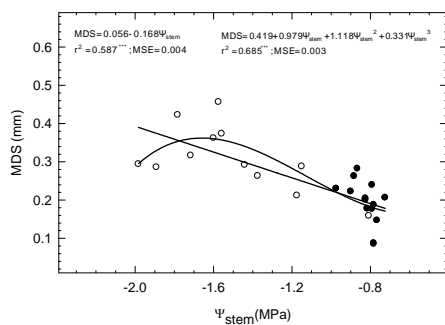
Taking into consideration the  $\Psi_{stem}$  values obtained during the experimental period and the MDS values taken at the same times, a polynomial relationship between both parameters ( $MDS (mm) = 0.419 + 0.979\Psi_{stem} (MPa) + 1.118\Psi_{stem}^2 (MPa) + 0.331\Psi_{stem}^3 (MPa)$ ,  $r^2 = 0.685$ ,  $MSE = 0.003$ ) was evident in the range of water stress studied ( $\Psi_{stem}$  values from  $-0.72$  to  $-1.98$  MPa) (Figure 2).

shrinkage (MDS), midday stem water potential ( $\Psi_{stem}$ ) and midday leaf conductance ( $g_i$ ) at different intervals of the 2009 water stress period. For each interval, mean signal or mean noise values that do not have a common letter are significantly different according to the  $LSD_{0.05}$  range test.

DOY		Mean signal	Mean noise	Signal: noise
209-217	MDS	1.24a	0.17a	7.31
	$\Psi_{stem}$	1.27a	0.21a	6.16
	$g_i$	1.04a	0.15a	6.93
209-224	MDS	1.31ab	0.17b	7.84
	$\Psi_{stem}$	1.46a	0.23a	6.27
	$g_i$	1.15b	0.15b	7.73
209-231	MDS	1.37ab	0.17b	7.95
	$\Psi_{stem}$	1.59a	0.22ab	7.13
	$g_i$	1.29b	0.24a	5.34
209-238	MDS	1.41b	0.17b	8.24
	$\Psi_{stem}$	1.72a	0.23a	7.39
	$g_i$	1.40b	0.23a	6.07
209-243	MDS	1.46b	0.18b	8.31
	$\Psi_{stem}$	1.81a	0.24a	7.63
	$g_i$	1.49b	0.26a	5.82

This relationship was characterized by two different phases. Above  $\Psi_{stem}$  values of  $-1.67$  MPa, MDS values increased sharply as  $\Psi_{stem}$  decreased, and when  $\Psi_{stem}$  values were below this threshold value the relationship changed and any further reduction in  $\Psi_{stem}$  was associated with a decrease in MDS. This is the behaviour more frequent in most species values [11]. However, Intrigliolo et al. [12], suggested that the best fit between MDS and  $\Psi_{stem}$  in pomegranate trees was obtained with a linear regression, and that there was not a single unique relationship between both variables valid for the whole season due to changes in fruit growth pattern and fruit removal. In this sense, our data also revealed the possibility of presenting the relationship between MDS and  $\Psi_{stem}$  by means of a first-order fit ( $MDS (mm) = 0.056 - 0.168\Psi_{stem} (MPa)$ ,  $r^2 = 0.587$ ,  $MSE = 0.004$ ) but the correlation obtained was worse than for the polynomial regression model (Figure 2). In our opinion, to clarify the model that defines the relationship between both variables, a higher number of MDS data points corresponding to  $\Psi_{stem}$  values below  $-1.67$  MPa would have been necessary.

**Table 1.** Mean signal intensity, mean noise, and signal:noise ratio of maximum daily trunk



**Figure 2.** Relationship between and maximum daily trunk shrinkage (MDS) and stem water potential ( $\Psi_{stem}$ ) in T0 (closed symbols) and T1 (open symbols) plants during the 2009 water stress period. Each value is the mean of four measurements

#### 4. Conclusions

The results indicated that MDS is a reliable plant-based water stress indicator in adult pomegranate trees. In addition, the fact that LVDT sensors used in the experiment did not have to be repositioned, together with other operational advantages over discretely measured indicators, such as the low labour costs involved and the possibility of connection to remotely operated irrigation controllers, confirm that MDS is a suitable plant-based indicator for precise irrigation scheduling practices based on plant water status measurements.

#### 5. Acknowledgements

This research was supported by CICYT/FEDER (AGL2010-19201-C04-01AGR) and AECID (A1/035430/11) grants to the authors. AG, JCG and ZNC were funded by a FPU, a FPI and a AECID grant, respectively.

#### 6. References

[1] Rodríguez, P., Mellisho, C.D., Conejero, W., Cruz, Z.N., Ortuño, M.F., Galindo, A., Torrecillas, A., 2012. Plant water relations of leaves of pomegranate trees under different irrigation conditions. *Environ. Exp. Bot.* 77: 19-24.

[2] Sarkhosh, A., Zamani, Z., Fatahi, R., Ebadi, A., 2006. RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes. *Sci. Hort.* 111: 24–29.

[3] Holland, D., Hatib, K., Bar-Yàakov, I., 2009. Pomegranate: botany, horticulture, breeding. *Hortic. Rev.* 35: 127–191.

[4] Fernández, J.E., Cuevas, M.V., 2010. Irrigation scheduling from stem diameter

variations: a review. *Agric. For. Meteorol.* 150: 135-151.

[5] Moriana, A., Girón, I.F., Martín-Palomo, M.J., Conejero, W., Ortuño, M.F., Torrecillas, A., Moreno, F., 2010. New approach for olive trees irrigation scheduling using trunk diameter sensors. *Agric. Water Manage.* 97: 1822-1828.

[6] Allen, R.G., Pereira, R.S., Raes, D., Smith, M., 1998. Crop evapotranspiration-guidelines for computing crop water requirements. FAO Irrigation and Drainage paper No 56. Rome, Italy, pp 15–27.

[7] SPSS Inc., 2002. SPSS Professional Statistics. Business Intelligence Division, v. 12, Chicago

[8] Ortuño, M.F., García-Orellana, Y., Conejero, W., Ruiz-Sánchez, M.C., Alarcón, J.J., Torrecillas, A., 2006 Stem and leaf water potentials, gas exchange, sap flow and trunk diameter fluctuations for detecting water stress in lemon trees. *Trees* 20: 1–8.

[9] Remorini, D., Massai, R., 2003. Comparison of water status indicators for young peach trees. *Irrig. Sci.* 22: 39–46.

[10] Goldhamer, D.A., Fereres, E., Mata, M., Girona, J., Cohen, M., 1999. Sensitivity of continuous and discrete plant and soil water status monitoring in peach trees subjected to deficit irrigation. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 124: 437-444.

[11] Ortuño, M.F., Conejero, W., Moreno, F., Moriana, A., Intrigliolo, D.S., Biel, C., Mellisho, C.D., Pérez-Pastor, A., Domingo, R., Ruiz-Sánchez, M.C., Casadesus, J., Bonany, J., Torrecillas, A., 2010. Could trunk diameter sensors be used in woody crops for irrigation scheduling? A review of current knowledge and future perspectives. *Agric. Water Manage.* 97: 1-11.

[12] Intrigliolo, D.S., Puerto, H., Bonet, L., Alarcón, J.J., Nicolás, E., Bartual, J., 2011b. Usefulness of trunk diameter variations as a continuous water stress indicators of pomegranate (*Punica granatum*) trees. *Agric. Water Manage.* 98: 1462-1468.

## Programación del riego en uva de mesa cv. *Crimson Seedless* a partir de indicadores de planta

M. Conesa, A. Pérez-Pastor, R. Domingo

Universidad Politécnica de Cartagena. Departamento de Producción Vegetal. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203. Cartagena (Murcia). España charo.conesa@upct.es

### RESUMEN

En una explotación comercial de uva de mesa tardía (*Crimson Seedless* x *Paulsen 1103*), se evaluaron, durante dos años consecutivos, líneas de referencia obtenidas a través de la relación entre la máxima contracción diaria del tronco (MCD) y distintas variables climáticas, a partir de la medida de la fluctuación del diámetro del tronco (FDT) en vides bien regadas, para ser utilizadas en la programación del riego a través de la intensidad de señal (IS) de la MCD, relación entre la MCD actual y la de referencia. Después del primer año, se comprobó que los mejores ajustes tenían lugar en pre-enero, antes del cambio de color de las bayas. La temperatura media diaria ( $T_{med}$ ) fue la variable climática que mejor explicó las variaciones de MCD ( $r^2=0,66$ ). El mantenimiento de  $IS = 1$  y del potencial hídrico de tallo a mediodía ( $\Psi_t$ ) de  $-0,65$  MPa resultaron ser indicadores idóneos de programación durante pre y post-enero, respectivamente para vides bien regadas. Además, la programación  $IS=1$  durante pre-enero de 2013 repercutió positivamente en el estado hídrico de la vid evaluado durante post-enero, incrementado en el doble el coeficiente de determinación observado en la relación MCD versus  $T_{med}$  del año anterior.

**Palabras clave:** *Vitis Vinifera* L., líneas de referencia, potencial hídrico de tallo al mediodía, máxima contracción diaria, intensidad de señal.

### 1. Introducción

La máxima contracción diaria del tronco (MCD) es un parámetro sensible al déficit hídrico y además fácilmente automatizable [14]. Es un parámetro procedente de la fluctuación diaria del diámetro del tronco (FDT), e integra, en gran medida, las condiciones hídricas del entorno clima-suelo. En cambio, esta ventaja dificulta su uso en una hipotética programación del riego a partir de sus valores absolutos, dada su elevada dependencia de la climatología. Por ello, [6] propusieron normalizar los valores actuales de MCD respecto a los de árboles bien regados, a partir de la denominada intensidad de señal ( $IS$ ,  $MCD_{actual}/MCD_{referencia}$ ), obteniéndose  $MCD_{referencia}$  a través de la relación MCD de árboles bien regados y climatología. De esta forma, el riego se controlaría a partir de  $IS$ , con  $MCD_{referencia}$  procedente de años anteriores, no siendo necesario disponer de árboles bien regados, en una finca comercial en el que el riego se programe de forma sostenible [4,13].

El principal objetivo del trabajo fue evaluar la programación del riego en uva de mesa cv.

Crimson, a través de  $IS$  de la MCD, a partir de líneas de referencia, controlándose el estado hídrico de la planta con el potencial hídrico de tallo a mediodía ( $\Psi_t$ ).

### 2. Materiales y Métodos

#### 2.1 Condiciones experimentales

El ensayo se realizó durante dos años consecutivos (2012 y 2013) en una explotación frutícola (38º 15' N; 1º 33' W) de uva de mesa cv. Crimson sobre Paulsen 1103 situada en el término municipal de Cieza (Murcia). Las vides de 11 años de edad y situadas a un marco de plantación de 4 x 4 m y en riego localizado (4 emisores por vid de 4 L h<sup>-1</sup>) se regaron al 110% de la evapotranspiración máxima del cultivo (ETc) al objeto de evitar condiciones limitantes de agua en el suelo. ETc fue estimada a partir de los coeficientes de cultivo de [15] y de la evapotranspiración diaria de referencia (ET<sub>0</sub>) [1]. El agua de riego procedente del trasvase Tajo-Segura presentó una conductividad eléctrica (CE<sub>25°C</sub>) cercana a 1,3 dS m<sup>-1</sup>. El sistema de



recogida de datos utilizado fueron dataloggers inalámbricos (WSN, wireless). Las variables climáticas utilizadas;  $ET_0$ , temperatura (T) y humedad relativa (HR), se obtuvieron de una estación climática próxima a la parcela experimental (CI42-[www.siam.es](http://www.siam.es)). El déficit de presión de vapor (DPV) se calculó a partir de T y HR. El diseño experimental consistió en 3 repeticiones distribuidas al azar por tratamiento de riego. Las labores culturales fueron las típicas de la zona. Destaca el anillado y la colocación de la malla antigranizo realizadas en junio y finales de agosto, respectivamente.

### 2.2 Medidas realizadas

Las medidas realizadas fueron: i) fluctuación del diámetro de tronco (FDT) a partir de 6 vides con sensores *lineal variable diameter transducers* (LVDT) instalados por debajo del punto de injerto a 1 m del suelo, ii) potencial hídrico de tallo a mediodía ( $\Psi_t$ ) obtenido con cámara de presión y de acuerdo al protocolo descrito por Hsiao (1990); iii) contenido volumétrico de agua en el suelo ( $\Theta_v$ ) con sondas FDR y (iv) diámetro de bayas con calibre digital. A partir de FDT se obtuvieron los siguientes parámetros [5]: i) máximo y mínimo crecimiento diario del diámetro del tronco (MXTD y MNTD), ii) máxima contracción diaria (MCD), obtenido de la diferencia entre MXTD y MNTD y iii) tasa de crecimiento diaria (TCD), obtenido por la diferencia entre el valor de MXTD en dos días consecutivos.

### 2.3 Programación del riego

La programación del riego en pre-enero de 2013, se realizó en base a la línea de referencia de mejor ajuste lineal en 2012. Semanalmente se corrigió el volumen de agua aportado para que IS de MCD ( $IS_{MCD}$ ) se mantuviera en torno a 1:

- i)  $IS_{MCD} > 1$  (durante 4 días o más) → subir el riego un 10 %
- ii)  $IS_{MCD} < 1$  o igual a 1 (durante 4 días o más) → bajar el riego un 10 %

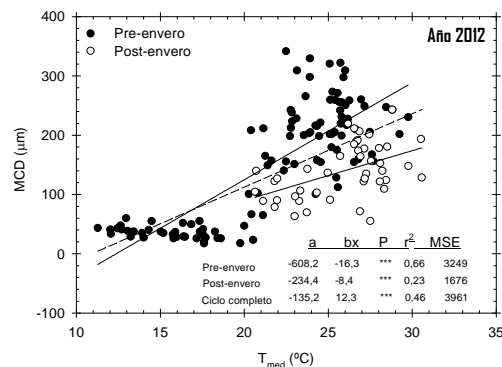
En ambos años, el periodo de estudio se dividió en dos periodos teniendo como base el envero o cambio de color de las bayas: pre-enero (de junio a agosto) y post-enero (de agosto a noviembre).

### 3. Resultados y Discusión

El clima se caracterizó por una  $ET_0$  de 1274 y 1253 mm y una pluviometría de 375 y 195 mm anuales, durante 2012 y 2013, respectivamente. En ambos años, el periodo de mayor demanda

hídrica coincidió con el final del pre-enero (meses de verano), alcanzando valores máximos de  $ET_0$ , DPV y T (8,1 mm d<sup>-1</sup>, 5,4 kPa y 42,3 °C).

El riego aplicado en 2012 (de junio a noviembre) fue de 237 y 418 mm en pre y post-enero, respectivamente. A lo largo del ciclo,  $\Theta_v$  mantuvo valores medios próximos a capacidad de campo (34%), promediando valores de  $\Psi_t$  de -0,68 y -0,65 MPa en pre y post-enero, respectivamente, indicativos de ausencia de estrés hídrico en el cultivo [2]. El crecimiento anual del tronco fue de  $2,42 \pm 1,24$  mm, registrándose la tasa de crecimiento (TCD) más elevada ( $\approx 110 \mu\text{m d}^{-1}$ ) en junio (pre-enero). Tras el anillado, TCD disminuyó sustancialmente ( $\approx 40 \mu\text{m d}^{-1}$ ) para volver a aumentar hasta finales de julio. Al inicio del envero (agosto), se observó una clara disminución de TCD a valores casi nulos, indicando un balance de carbono desfavorable para el tronco debido a la alta competencia por fotoasimilados entre órganos en desarrollo [3]. MCD reflejó una alta dependencia con la climatología en vides bien regadas, alcanzando valores máximos antes del envero ( $\approx 330 \mu\text{m}$ ). La temperatura media ( $T_m$ ) fue la variable que mejor correlacionó con MCD (Fig. 1), similar a lo observado en limonero por [11]. Sin embargo, en otros cultivos frutales como en olivo [10] ciruelo [8] y nectarino [4], la relación MCD *versus* DPV fue la que alcanzó coeficientes de correlación más altos. Este hecho puede estar relacionado con la influencia de la malla que protege al cultivo, al generarse un microclima que incrementa HR y en consecuencia, alterando los valores de DPV.

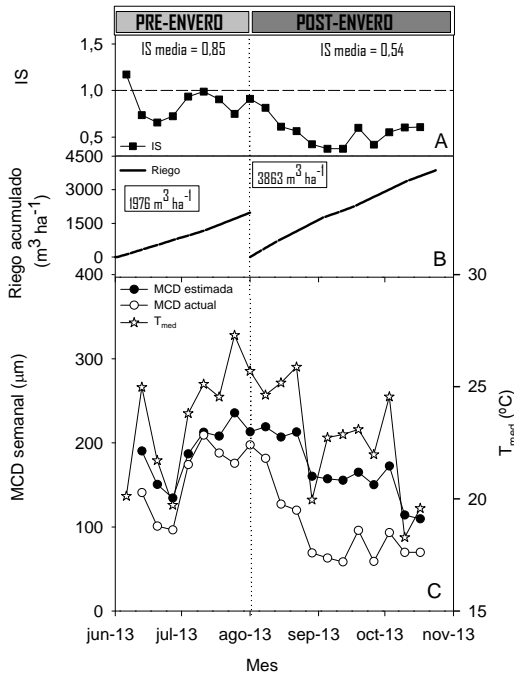


**Figura 1.** Relación lineal obtenida entre MCD *versus*  $T_{med}$  durante el año 2012 para los periodos de pre (●) y post-enero (○), respectivamente. Cada valor de MCD es la media de 6 sensores LVDT. La línea discontinua representa la relación obtenida media del ciclo completo

En post-enero fue también  $T_m$ , la que presentó el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) más alto

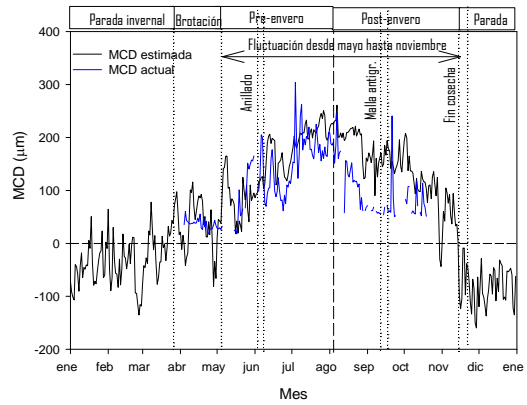
(0,23), aunque muy inferior al de pre-enero, indicando la escasa idoneidad de MCD para ser utilizado en la programación del riego en este periodo [9].

A partir de la línea de referencia obtenida en 2012, se programó el riego durante pre-enero de 2013, manteniendo  $IS_{MCD} \approx 1$ .  $IS$  promedió 0,84 durante este período, y TCD y MCD estuvieron en torno a  $150 \mu m d^{-1}$  y  $300 \mu m$ , respectivamente, valores muy similares a los obtenidos el año anterior (Fig. 2). Asimismo, se redujo un 17% el volumen de agua aplicado el año anterior, con una  $ET_0$  y precipitación similares ( $368 \text{ mm}$  y  $0,8 \text{ mm}$ , respectivamente). En post-enero, el indicador escogido fue  $\Psi_t$ , manteniéndose sus valores próximos a  $-0,65 \text{ MPa}$ ; de esta forma, el riego se redujo un 8% con respecto al registrado durante el año 2012.



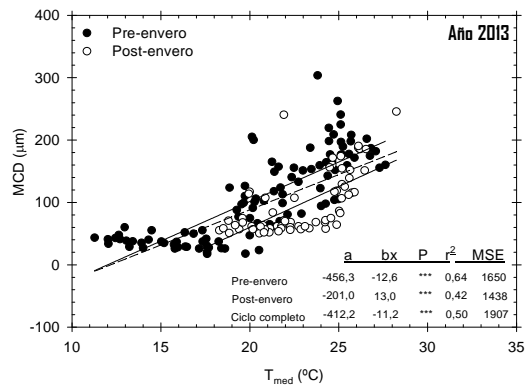
**Figura 2.** Evolución estacional semanal de: (A) la intensidad de señal (■); (B) del riego acumulado durante pre y post-enero (—); (C) y de la MCD estimada (●), MCD actual o observada (°) y la temperatura media (☆) obtenidas durante la programación del riego del año 2013. Cada valor de MCD actual es la media de 6 sensores LVDT.

$MCD_{actual}$  presentó una dinámica similar a la  $MCD_{referencia}$  estimada a partir de la ecuación obtenida en 2012, lo que evidenció la bondad del ajuste de programación  $IS_{MCD} = 1$ , junto a una fluctuación positiva de MCD desde abril hasta noviembre (Fig. 3). En mandarino, [13], consideraron como periodo de programación de riego en base a MCD de marzo a octubre, el cual cubría las fases I y II de crecimiento del tronco ( $\approx 80\%$  de las necesidades hídricas del cultivo).



**Figura 3.** Evolución estacional de la MCD estimada a partir de la línea de referencia propuesta (línea negra) y de la MCD actual o observada (línea azul) durante el año 2013. Cada valor de MCD actual es la media de 6 sensores LVDT. Las líneas verticales discontinuas delimitan los periodos fenológicos del cultivo.

Finalmente, el mantenimiento de  $IS$  en torno a 1 durante pre-enero de 2013, en base a la línea MCD y  $T_{med}$ , repercutió positivamente en las relaciones hídricas observadas en post-enero. De esta forma el estado hídrico de las vides, evaluado a partir  $\Psi_t$  se mantuvo constante en torno a  $-0,85 \text{ MPa}$ , y el coeficiente de determinación de la regresión MCD versus  $T_{med}$ , se incrementó en el doble ( $r^2=0,42$ ) al obtenido durante post-enero de 2012 (Fig. 4).



**Figura 4.-** Relación lineal obtenida entre MCD versus  $T_{med}$  durante el año 2013 para los periodos de pre (●) y post-enero (°), respectivamente. Cada valor de MCD es la media de 6 sensores LVDT. La línea discontinua representa la relación obtenida media del ciclo completo

#### 4. Conclusiones

La intensidad de señal de MCD igual a la unidad, junto al mantenimiento de  $\Psi_t$  en torno a  $-0,65 \text{ MPa}$  resultaron ser indicadores idóneos de

programación para vides bien regadas durante pre y post-verano, respectivamente. La programación del riego durante pre-verano en base a la línea de referencia MCD *versus*  $T_{med}$  supuso una reducción del 17% del riego aplicado respecto a la programación en base a ETC del año anterior.

## 5. Agradecimientos

El presente trabajo se realizó en una finca comercial perteneciente a la empresa Frutas Esther SA, al amparo del proyecto CYCIT (AGL-2010-19201-C04-04) financiado por el ministerio de Educación y Ciencia. María R. Conesa, disfrutó de una ayuda del programa de formación de profesorado universitario (FPU).

## 6. Referencias bibliográficas

- [1] Allen R.G., Pereira L.S., Raes D. y Smith M. 1998. Crop evapotranspiration. Guidelines for computing crop water requirements. Irrigation and Drainage, 56. FAO, Rome, Italy. 300pp.
- [2] Conesa MR., de la Rosa JM., Corbalán M., Domingo R. y Pérez-Pastor A. 2012. Evaluación del déficit hídrico en uva de mesa. Primeros Resultados. XXX Congreso Nacional de Riegos y Drenajes (AERYD).
- [3] Daudet F., Ameglio T., Cochard H., Archilla O. y Lacoine A. 2005. Experimental analysis of the role of water and carbon in tree stem diameter variations. J. Experim. Bot. 56:135–144
- [4] De la Rosa J.M., Conesa M.R., Domingo R., Torres R., Pérez-Pastor A., 2013. Feasibility of using trunk diameter fluctuation and stem water potential reference lines for irrigation scheduling of early nectarine trees. Agric Water Manag. 126: 133-141.
- [5] Goldhamer D.A. y Fereres E. 2001. Irrigation scheduling protocols using continuously recorded trunk diameter measurements. Irrig. Sci. 20:115–125
- [6] Goldhamer D.A. y Fereres E. 2004. Irrigation scheduling of almond trees with trunk diameter sensors. Irrig. Sci. 23:11–19
- [7] Hsiao, T.C., 1990. Measurements of plant water status. In: Steward, B.A., Nielsen, D.R. (Eds.), Irrigation of Agricultural Crops. Agronomy Monograph No 30. American Society of Agronomy, Madison, Wis. p. 243–279.
- [8] Intrigliolo D.S., Castel J.R., 2006. Usefulness of diurnal trunk shrinkage as a water stress indicator in plum trees. Tree Physiol. 26: 303–311.
- [9] Intrigliolo D.S. y Castel J.R., 2007. Evaluation of grapevine water status from trunk diameter variations. Irrig. Sci. 26: 49–59.
- [10] Moreno, F., Conejero, W., Martín-Palomo, M.J., Girón, I.F., Torrecillas, A., 2006. Maximum daily trunk shrinkage reference values for irrigation scheduling in olive trees. Agric Water Manag. 84: 290–294.
- [11] Ortuño M.F., García-Orellana Y., Conejero W., Ruiz-Sánchez M.C., Mounzer O., Alarcón J.J. y Torrecillas A. 2006. Relationships between climatic variables and sap flow, stem water potential and maximum daily trunk shrinkage in lemon trees. Plant Soil, 279: 229–242.
- [12] Ortuño M.F., Conejero W., Moreno F., Moriana A., Intrigliolo D.S., Biel C., Mellisho C.D., Pérez-Pastor A., Domingo R., Ruiz-Sánchez M.C., Casadesus J., Bonany J., Torrecillas A. 2010. Could trunk diameter sensors be used in woody crops for irrigation scheduling? A review of current knowledge and future perspectives. Agric Water Manag. 97: 1–11.
- [13] Pagan E., Perez-Pastor A., Domingo R., Conesa M.R. y Caro, M., 2012. Suitability of trunk diameter reference lines for irrigation scheduling with saline water in late mandarin trees with different crop load. Agric Water Manag. 111: 11–19.
- [14] Puerto P., Domingo R., Torres R., Pérez-Pastor A. y García-Riquelme M. 2013. Remote management of deficit irrigation in almond trees based on maximum daily trunk shrinkage. Water relations and yield. Agric Water Manag. 126, 33-45.
- [15] Williams L.E., Phene C.J., Grimes D.W. y Trout T.J. Water use of young *Thomson Seedless* grapevines in California. 2003. Irrig. Sci. 22: 1–9.

## Balance de agua y nitrógeno en un cultivo de pimiento grueso en el Campo de Cartagena

J. Navarro<sup>(1)</sup>, F.M. del Amor<sup>(2)</sup>, J. Cánovas<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia, Plaza Juan XXIII s/n, 30008. Murcia. España. joanquin.navarro@carm.es

<sup>(2)</sup> Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario, C/ Mayor, s/n, 30150. La Alberca (Murcia). España.

### RESUMEN

Se diseñó un experimento consistente en la construcción de 8 lisímetros de drenaje bajo invernadero en Torre-Pacheco. En los años 2003, 2004, 2005 y 2006 se ensayaron en dicho invernadero tres técnicas de cultivo diferentes (T-E:ecológico, T-I:integrado y T-C:convencional) en pimiento grueso, que han permitido, contando con la información obtenida durante cuatro años sobre abonado nitrogenado y riego, evaluar las pérdidas de nitratos en el agua de drenaje.

Los resultados permiten comprobar como es la relación entre el nitrógeno aportado y el lixiviado para los sistemas de cultivo estudiados, corroborando como una mayor cantidad de abonado se corresponde con una lixiviación de nitrógeno mayor, para las mismas dosis de riego; pero sin perder de vista que en las parcelas testigo, sin aportación de nitrógeno mineral, se han medido considerables lixivitaciones de nitratos, aunque menores que en las parcelas con abonado mineral.

Durante el desarrollo de esta investigación se ha comprobado, además, que una disminución de las dosis de nitrógeno respecto a las normalmente utilizadas en la zona de estudio produce cosechas similares. La dosis de 15 g N/m<sup>2</sup> de abono mineral (nitrato cálcico + nitrato potásico) combinada con el aporte de 4 kg/m<sup>2</sup> de estiércol fermentado se ha mostrado como la más eficaz en relación con la producción. Todo ello indica que el tratamiento T-E acompañado de aportes adicionales de nitrógeno mineral, inferiores a los realizados en los T-I y T-C, constituiría una fertilización óptima que aseguraría la producción y longevidad del cultivo de pimiento.

**Palabras clave:** lixiviación de nitratos, *Capsicum annuum L.*, fertirrigación, abonado nitrogenado, invernadero.

### 1. Introducción

El cultivo del pimiento bajo invernadero constituye un ejemplo típico de las nuevas orientaciones productivas de la agricultura comercial de la Región de Murcia, donde actualmente ocupa más de 1.200 ha de superficie y supone una producción anual en torno a las 110.000 t, (CREM, 2013), de la cual más del 50% se dedica a exportación. Es el cultivo que más superficie ocupa bajo invernadero en la Comarca del Campo de Cartagena, con más de 1.000 ha, siendo los Municipios más importantes Torre-Pacheco, San Javier y San Pedro del Pinatar, con 535, 357 y 105 ha respectivamente en 2013 (CREM, 2013).

El elevado rendimiento de este cultivo dentro de las orientaciones productivas presentes en la agricultura murciana está determinado por la incorporación masiva de tecnologías avanzadas: cultivo bajo invernadero, acolchado, riego localizado, climatización, etc., siendo por ello

uno de los paradigmas de la moderna agricultura tecnificada y artificial. Sin embargo, la tendencia actual plantea la sustitución de tecnologías químicas por técnicas físicas o biológicas menos agresivas para el medioambiente. Teniendo en cuenta que el uso de fertilizantes hoy por hoy es necesario en la agricultura intensiva y las exigencias de los mercados europeos en cuanto a los niveles de residuos y el empleo de buenas prácticas agrícolas, es evidente la repercusión económica y social que tiene el estudio que planteamos sobre este cultivo y su ámbito de producción.

La exigencia de altas producciones y de gran calidad hace necesario que la aportación del riego y de los fertilizantes se haga por el método de la fertirrigación localizada, cuya eficiencia respecto a los métodos convencionales está ampliamente demostrada (Breschini y Hartz, 2002). Un aporte óptimo de nitrógeno y de agua es esencial para el desarrollo de las plantas y

para la productividad y longevidad de los cultivos hortícolas (Aloni et al., 1991; Huett, 1996). No obstante, existe una tendencia desde siempre a la aplicación excesiva de fertilizantes y de riego, que en el caso de fertilizantes nitrogenados favorece el crecimiento vegetativo y viene acompañada de una menor producción, siendo considerada una sobre-fertilización (Weinbaum et al., 1992). El objetivo de este ensayo es establecer un balance del agua y del nitrógeno en el cultivo de pimiento de invernadero que permita conocer las pérdidas por lixiviación de estas sustancias y las dosis más adecuadas de aplicación.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Estructura experimental y tratamientos

Los ensayos se ubicaron en de un invernadero multicapilla sin calefacción de dimensiones 32 x 40 m<sup>2</sup>, orientación Noroeste-Sureste, con ventilación cenital, humidificación por nebulización y riego por goteo, situado en el Centro Integrado de Formación y Experiencias Agrarias de Torre-Pacheco (Murcia). En el interior de dicho invernadero se construyeron 8 lisímetros de drenaje, que constituyen la estructura fundamental del proyecto. Los lisímetros tienen forma prismática, de sección cuadrangular cuya base superior, horizontal, mide 7,80 metros de largo por 6,65 metros de ancho. Su profundidad varía entre 0,7 m. en la parte del lateral del invernadero y 0,8 m. junto a la zanja central.

Se ensayaron los siguientes tratamientos:

T-E (tratamiento ecológico). La fertilización de dos parcelas se realizó antes de la plantación con la aplicación de estiércol bien fermentado, a razón 4 kg/m<sup>2</sup>. Esta aplicación de estiércol se realizó también en el tratamiento integrado y en el convencional.

T-I (tratamiento integrado). La fertilización de tres 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.

T-C (tratamiento convencional). Para la fertilización de estas tres parcelas se aplicó el abonado mineral 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, superando ligeramente el límite

superior establecido en las Normas Técnicas para la Producción Integrada.

### 2.2 Fertilizantes aplicados y N disponible

Se ha abonado por fertirrigación, pues se considera el método más eficaz de aplicación de fertilizantes, basándonos en el conocimiento de las curvas de absorción mineral del cultivo, que reflejan la absorción de nutrientes en función del tiempo. Se han escogido los abonos más comúnmente usados en la zona, de entre los existentes en el mercado, siendo los abonos nitrogenados aplicados el (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Ca y el KNO<sub>3</sub>. En la tabla 1 se refleja el abonado mineral aplicado durante cada año y para cada tratamiento.

Respecto al nitrógeno disponible para el cultivo, con el agua de riego se aportaron como media 1,1 g/m<sup>2</sup> de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, que equivalen a 0,25 g N/m<sup>2</sup>, lo que apenas supone entre el 2 y el 0,5 % del nitrógeno mineral aportado en la fertilización, por lo que puede considerarse despreciable. En cuanto al nitrógeno liberado por el estiércol aportado, se calcula tras realizar los análisis de suelo en una media de 9 g N/m<sup>2</sup>, y el de la materia orgánica del suelo de 2,5 g N/m<sup>2</sup>.

### 2.3 Necesidades hídricas y programación del riego

Para el cálculo del riego, que ha sido igual para los distintos tratamientos, nos hemos basado en el método de Penman (1948) y las directrices de la FAO (Doorenbos y Pruitt, 1977). Para la medida de la evapotranspiración de referencia se utilizó el método del tanque evaporimétrico cubeta clase A. El tanque se colocó en el interior del invernadero y se tomaron lecturas semanales.

La eficiencia de aplicación que se obtuvo en el ensayo fue:  $E_{fa} = E_{fp} \times E_{fu} \times E_{fs} = 1 \times 0,9 \times 0,936 = 0,843$ . La frecuencia de los riegos se controló mediante el uso de tensiómetros colocados en dos de las parcelas experimentales a 15, 30 y 60 cm. de profundidad. Otro control que se empleó para la irrigación se basó en la conductividad de los lixiviados en sondas, que debía estar entre 2,5 y 5 dS/m.

Durante los ensayos se aplicó a lo largo de todo el cultivo, desde la plantación a la recolección (7-8 meses), una media de 70,86 m<sup>3</sup> de agua por m<sup>2</sup> (7086 m<sup>3</sup>/ha), con pequeñas variaciones entre unidades experimentales menores al 5 %. Las variaciones entre años son debidas a la climatología, ya que se riega con la ET<sub>c</sub>. En el caso del año 2005 hubo un exceso de riego por

ser un año muy calido y más largo el ciclo del cultivo y en el caso del año 2004 lo contrario.

### 3. Resultados y Discusión

En la Figura 1 se observa la diferencia entre el volumen de agua aplicado y el lixiviado, que ha supuesto como término medio un 19% del agua aplicada para los cuatro años. Este porcentaje de agua drenada, que varía del 15,7% al 23,4%, puede considerarse normal para este tipo de suelos y cultivo e indica que el riego se ha realizado adecuadamente y el efecto de la lixiviación de nitratos del ensayo no se puede atribuir a un exceso de riego y sí a un exceso de abonado.

En lo que respecta a la relación entre el nitrato mineral aportado y el lixiviado, en la Tabla 2 se observan los datos medios obtenidos en cuanto al volumen lixiviado, nitrato aportado y nitrato lixiviado, por tratamiento.

La expresión cuantitativa del nitrato lixiviado es el resultado de multiplicar la concentración de nitrato por el volumen de lixiviado día a día, expresado todo ello en g de esa sustancia. Si comparamos con la columna de nitrato aportado por tratamiento, expresada en g de nitrato, se pone de manifiesto que los sistemas estudiados vierten al exterior cantidades considerables de este elemento, que varían desde los 9,54 g/m<sup>2</sup> de pérdidas para el T-E a los 21,39 g/m<sup>2</sup> de media del T-C. Es reseñable ver cómo incluso el tratamiento sin abonado nitrogenado da un lixiviado considerable de nitratos en el drenaje.

### 4. Conclusiones

Durante los cuatro años en los que se realizó el ensayo, se han aplicado dosis de agua a lo largo de todo el ciclo que varían desde 8.244 m<sup>3</sup>/ha del año 2005 hasta 5.611 m<sup>3</sup>/ha del año 2004, habiendo variado el drenaje entre 15,7% en el año 2004 y 23,4% en el año 2003. De estos datos no se puede deducir que exista una correlación positiva entre el volumen de agua aplicada y la lixiviada, ya que regamos según la Eto (variaciones climáticas) y en teoría debe producirse el mismo drenaje todos los años.

Las variaciones en el riego de un año a otro no han tenido efecto en la cosecha, por lo que se puede afirmar que estando dentro de estos márgenes de riego (5.500-8.000 m<sup>3</sup>/ha) aplicamos el agua necesaria para que el buen desarrollo del cultivo no se vea afectado y se lixiviará tanto menos agua cuanto más nos

acerquemos a la dosis menor de riego y mejor se haya dosificado este.

En lo que se refiere al balance de nitrógeno, existe una correlación positiva entre el nitrato aportado y el lixiviado, así como con la concentración de nitratos en los lixiviados para los tres tratamientos ensayados. Es reseñable ver como el tratamiento en el que sólo se aplicó abonado orgánico (T-E) también origina lixiviación de nitratos, no obstante el peligro de contaminación es mucho mayor en los tratamientos con abonado mineral, llegando a dar el T-C niveles que pueden considerarse contaminantes.

Durante el desarrollo de esta investigación de fertilización en el cultivo del pimiento 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/m<sup>2</sup> de abono mineral (nitrato cálcico + nitrato potásico) combinada con el aporte estimado de 10 g N/m<sup>2</sup> proveniente del estiércol y del agua de riego se ha mostrado como la más eficaz en relación con la producción. Todo ello indica que el tratamiento T-E acompañado de aportes adicionales de nitrógeno mineral, inferiores a los realizados en los T-I y T-C, constituiría una fertilización óptima que aseguraría la producción y longevidad del cultivo de pimiento.

Nuestros ensayos corroboran como la disminución del abonado nitrogenado de origen mineral en pimiento de invernadero 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. Algunos autores lo explican como que una disminución del aporte de N favorece la translocación de asimilados hacia los órganos reproductivos, a expensas de un menor crecimiento vegetativo (Gao et al., 1996). Por el contrario, una excesiva fertilización con N, que favorece la asimilación del mismo, ha sido correlacionada con una reducción del número de frutos y de la producción (O'Sullivan, 1979; Aliyu, 2000).

### 5. Agradecimientos

Esta investigación ha sido financiada por el INIA durante los años 2004, 2005 y 2006 (Proyecto RTA-04-035, en colaboración con la Comunidad Autónoma) y el resto de los años con fondos propios del 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 bibliográficas

- [1] 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.
- [2] Aliyu, L., 2000. Effect of organic and mineral fertilizers on growth, yield and composition of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Biol. Agric. Hortic.* 18, 29-36.
- [3] Breschini, S.J., Hartz, T.K. 2002. Drip irrigation management affects celery yield and quality. *HortScience*, 37(6): 894-897.
- [4] CREM. 2013. Estadística Agraria regional. Centro Regional de Estadística de Murcia. Consejería de Economía y Hacienda.
- [5] Doorenbos, J., W.O. Pruitt. 1977. Las necesidades de agua de los cultivos. FAO. Riego y Drenaje, nº 24.
- [6] Gao, Z.F., Sagi, M. and Lips, H., 1996. Assimilate allocation priority as affected by nitrogen compounds in the xylem sap of tomato. *Plant Physiol. Bioch.* 34, 807-815.
- [7] Huett, D.O., 1996. Prospects for manipulating the vegetative reproductive balance in horticultural crops through nitrogen nutrition: A review. *Aust. J. Agr. Res.* 47, 47-66.
- [8] O'Sullivan, J., 1979. Response of pepper to irrigation and nitrogen. *Can. J. Plant Sci.* 59, 1085-1091.
- [9] Penman, H.L. 1948. Natural evaporation from open water bare soils and grass. *Proceeding of the Royal Society of London. A*, 193:120-146
- [10] Weinbaum, S.A., Johnson, R.S. and Dejong, T.M., 1992. Causes and consequences of overfertilisation in orchards. *Hort. Technology.* 2, 112-120.

### Tablas y figuras

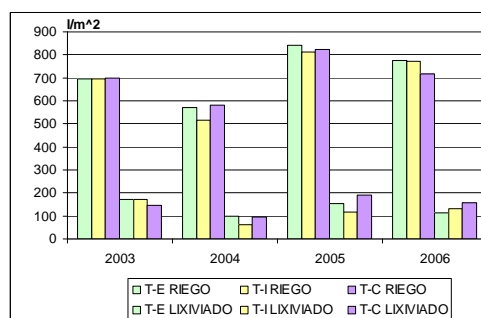
**Tabla 1.** - Abonado mineral aplicado durante cada año y para cada tratamiento.

Años		N <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	CaO	MgO	S
		g/m <sup>2</sup>	g/m <sup>2</sup>	g/m <sup>2</sup>	g/m <sup>2</sup>	g/m <sup>2</sup>	g/m <sup>2</sup>
2003	T-E	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	T-I	15,7	7,8	28,3	13,4	5,0	4,0
	T-C	31,4	15,6	56,6	26,8	10,0	8,0
2004	T-E	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	T-I	15,1	8,8	27,0	13,0	5,0	4,0
	T-C	30,2	17,6	54,0	26,0	10,0	8,0
2005	T-E	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	T-I	15,1	9,0	27,0	12,6	5,2	10,1
	T-C	30,3	18,0	54,0	25,2	10,4	20,3
2006	T-E	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	T-I	14,4	9,0	27,0	11,3	5,2	10,1
	T-C	28,7	18,0	54,0	22,6	10,4	20,3

**Tabla 2.** Nitrato mineral aportado y lixiviado, media de los años 2003, 2004, 2005 y 2006.

Tratam.	Vol. agua lixiviado (l/m <sup>2</sup> )	Nitrato aportado (g/m <sup>2</sup> )	Nitrato lixiviado (g/m <sup>2</sup> )
T-E	138,5 a	0,00 a	9,54 a
T-I	112,9 a	33,07 b	14,31 b
T-C	147,1 a	63,31 c	21,39 c

Valores medios con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí a p<0,05 ( test de Tukey).



**Figura 1.-** Volumen de agua aplicada y lixiviada años 2003, 2004, 2005 y 2006 (l/m<sup>2</sup>).

## Composition and depth of Extensive Green Roof substrate affect the growth of two Mediterranean plant species under different irrigation conditions

S. Ondoño<sup>(1)</sup>, J.J. Martínez<sup>(2)</sup>, J.L. Moreno<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Grupo de Enzimología y Biorremediación de Suelos y Residuos Orgánicos. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), Murcia. [sotovar@cebas.csic.es](mailto:sotovar@cebas.csic.es)

<sup>(2)</sup> Departamento de Producción Vegetal (ETSIA), Universidad Politécnica de Cartagena.

### RESUMEN

Recently, the design of new substrates capable of sustain an adequate plant development in Green Roof systems under Mediterranean climatic conditions is a challenge due to the unfavorable hot and dry conditions. The use of suitable light-weight substrates which can promote an adequate plant growth and maintenance over time is an important achievement as well as the plant species selection. The most commonly used plants in Green Roof systems are the Crassulacean since they are perfectly fitted to drought conditions. In this sense, the use of herbaceous and shrub endemic Mediterranean species could provide an added value in green roof designing under semi-arid conditions. Therefore, we aim to evaluate the growth of two endemic species (*Silene vulgaris* (Moench) Garcke and *Lagurus ovatus* L.) in two different substrate types with two different depths. To be precise, one substrate was made of a mixture of compost and crushed bricks (CB) (1:4; v:v), and the other one was made of compost-soil-bricks (CSB) (1:1:3; v:v:v). Physicochemical, biochemical as well as microbiological properties were evaluated in both substrates in order to study its suitability as plant growth basis. The results showed that both substrates showed adequate physicochemical properties to promote plant growth, but the CSB mixture presented better biochemical and microbiological properties than CB, allowing a suitable environment for microbial and plant development. Furthermore, both plant species had higher coverage and greater SPAD values in CSB than in CB mixture, and this growing was higher above deeper substrates (10 cm) than on 5 cm-substrate depth, being this parameter more significant for plant development than substrate composition.

**Keywords:** Green roof; artificial substrates; irrigation; plant coverage; SPAD.

### 1. Introduction

Extensive green roofs are light-weight systems with minimal substrate depth and minimal maintenance requirements [1]. Green roof substrates should be light-weight, chemically inert, physically stable, and they should retain adequate amounts of water and minerals for sufficient plant growth [2]. The majority of green roof substrates tend to be dominated by mineral-based components with an organic matter that varies according to the green roof type [1]. Typically, its composition is made of 80% to 100% of mineral and 0% to 20% of organic matter, which contribute to water- and nutrient-holding capacities [3].

Recently, the design of new substrates capable of sustain an adequate plant development

under Mediterranean climatic conditions is a challenge due to the unfavorable hot and dry semi-arid conditions. Therefore, the use of suitable light-weight substrates which can promote an adequate plant growth and maintenance over time is an important achievement in the Mediterranean area as well as plant species selection. The use of herbaceous and shrub endemic plants could provide an added value in green roof designing, taking into account that endemic species are also well adapted to these conditions.

On the other hand, irrigation is needed in extensive green roofs under Mediterranean climate, but the amount and the frequency is related to plant species and substrate type and depth. A high substrate depth would be desirable for water retention in a dry roof



management scenario, but on the other hand, this would pose the risk of excessive weight after heavy downpours [4]. Therefore, we have to find a suitable substrate-depth to promote plant growth and, at the same time, to avoid an excessive substrate bulk. For this proposal, we have tested two different materials in two different depths in order to find an appropriate substrate for being used under Mediterranean climatic conditions. To be precise, one substrate was made of a mixture of compost and crushed bricks (CB) in 1:4 volumetric proportions, and the other one was made of compost-soil-bricks (CSB) (1:1:3; v:v:v). Both of them were prepared in two depths: 5 and 10 cm. We conducted an assay at field level to evaluate the effect of substrate composition and depth into two Mediterranean plant species under irrigated (40% of  $ET_0$  values) and non-irrigated regime. In this sense, we postulated that in an extensive green-roof experiment: i) the mixture CSB may have better biochemical and microbiological properties to enhance plant growth than CB, ii) both plant species will have better development in deeper substrates than in 5 cm-substrate depth, iii) 40% of  $ET_0$  irrigation conditions can allow plant growth, but plants could not develop properly under non-irrigated conditions.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Substrates, plant species and irrigation conditions

We tested two different substrates in two depths: 5 and 10 cm. These substrates are compost mixed with crushed bricks (CB), in a 1:4 volumetric ratio, and compost mixed with soil and crushed bricks (CSB) in 1:1:3 (v:v:v). Two plant species were tested in these substrates; *Silene vulgaris* (Moench) Garcke, and *Lagurus ovatus* L.

Seeds of both plant species were sown in each substrate using a planting framework (5x5 cm). Each type of substrate was prepared in triplicate for each species and for each substrate depth. For this proposal, we designed six stainless "cultivation tables" with dimensions of 3x1.5 m everyone. Each cultivation table was composed of eight units of planting, measuring 0.75 x 0.75 x 0.20 m, so there were 48 different units. Three of those cultivation tables were assigned to non-irrigated conditions and the other three were subjected to irrigation at 40% of the potential evapotranspiration ( $ET_0$ ) registered values. The essay was conducted in an experimental farm located in Santomera (Murcia) from November-12 to July-2013.

### 2.2. Substrate measurements

Physicochemical properties (water holding capacity, wilting point, bulk density, porosity, organic matter content, TC, and TN) were measured in each substrate. Besides, analyses of principal biochemical and microbiological properties were carried out (enzyme activities related to C, N, and P cycles) in order to study each substrate from an agronomic point of view initially and at the end of the trial.

### 2.3. Plant measurements

Plant coverage was measured by digital image analysis using a digital camera and the RSI ENVI 4.0 software to process the images. SPAD (soil-plant analysis development) index was measured in both plant species to estimate the chlorophyll state during the growing season (April-May 2013). Finally, all plants were cut and dried to estimate the aboveground-biomass dry weight of each species as well as the water-use efficiency (WUE) by each unit. Plant samples were pulverized in a grinder, and then the nutrient content was also measured in plant tissues.

### 2.4. Statistical analysis

All the results are reported as means of triplicate analyses ( $n=3$ ). The ANOVA for repeated measures was carried out in order to determine the statistical significance of the differences in the values of each variable between the sampling times (intra-subject). Thereafter, Tukey's *post-hoc* test was performed to determine the HSD (honestly significant differences) of the mean values of each variable between substrate type and depth (inter-subjects).

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Substrate measurements

CB had higher porosity and less density than CSB, which are both good properties for green roof substrate designing [5-8], while CSB presented greater organic matter content as well as higher water-holding capacity (Table 1) owing to organic matter can act as an adhesive between soil particles, resulting in improved moisture-holding capabilities [9]. All these properties are of paramount importance in plant growth.

An enhancement of TC, TOC, and TN was observed in all substrates for both plant species regarding to the start of the trial, and between irrigated and non-irrigated conditions, especially in CSB substrates, being this enhancement more significant with substrate

type than with substrate depth. The amount of humic substances also increased in CSB, and especially to the depth of 10 cm, whereas in CB5 the amount of fulvic acids significantly ( $p < 0.05$ ) decreased with time. These C and N trends can affect the enzyme activity in each substrate.  $\beta$ -GLA and URA are extracellular hydrolase enzymes which are involved in C and N cycles, respectively, and are related with the organic matter decomposition pathways. Both activities increased with the experimental time, and were promoted in CSB mixture as well as in deeper substrates.

### 3.2. Plant measurements

Plant coverage was significantly higher ( $p < 0.05$ ) in deeper substrates, above all in CSB mixture for both species, being this coverage significantly higher for *L. ovatus* than for *S. vulgaris* (Fig. 1).

Chlorophyll content (SPAD index) was greater in *S. vulgaris* than in *L. ovatus* for all substrates tested (Fig. 2) due to the first one is a perennial specie which remains green throughout the year, and the other one is an annual specie which withers to the arrival of summer. Both species showed higher SPAD values in deeper substrates than in 5 cm-substrate depth. Other authors [10] also obtained the same results; significantly higher SPAD values in deeper profiles.

The aboveground biomass measured in each unit also followed this tendency; the substrate depth is more influential than the substrate type in plant growth, being the most important indicator of plant successful in green roofs [5]. WUE was also significantly higher in deeper substrates than in shallower ones (Table 2), being higher in CSB10 substrate than in CB10, and was significantly greater for *L. ovatus* than for *S. vulgaris* for every substrate.

In general, some authors [11, 12] have found the substrate depth as a most influential factor on plant physiology than the substrate type when grown on green roof systems.

## 4. Conclusions

It has been shown that the soil made substrate (CSB) better promote the enzymatic activity than CB mixture, being these effects more pronounced with the substrate depth. In CSB mixtures there were a great enzymatic activity related to C, and N cycles, which increased throughout the experiment. These characteristics lead to an adequate plant development in these substrates for both Mediterranean species.

Regarding to plant growth and production we assess that the substrate depth is a more influential factor than the substrate type, although CSB10 mixture is the most suitable combination from every point of view. Both plant species had an appropriate development under irrigation conditions (40% of  $ET_0$ ), but none could grow without water supplies.

## 5. Acknowledgments

The authors thank the INNPACTO project (IPT-2011-1017-310000) by funding from the relevant trial.

## 6. References

- [1] Forschungsgesellschaft Landschaftsentwicklung Landschaftsbau e.V. (FLL). 2008. Richtlinien für die Planung, Ausführung und Pflege von Dachbegrünungen. Richtlinien für Dachbegrünungen (Guideline for the planning, execution and upkeep of green-roof sites). Selbstverlag, Troisdorf.
- [2] Kotsiris, G., P.A. Nektarios, and A.T. Paraskevopoulou. 2012. *Lavandula angustifolia* growth and physiology is affected by substrate type and depth when grown under Mediterranean semi-intensive green roof conditions. HortScience 47, 311-317.
- [3] Beattie, D.J. and R.D. Berghage. 2004. Green roof media characteristics: The basics, p. 411-416. In: Proc. of 2nd North American Green Roof Conference: Greening Rooftops for Sustainable Communities, Portland, OR, 2–4 June 2004. The Cardinal Group, Toronto, Canada.
- [4] Benvenuti, S. and D. Bacci. 2010. Initial agronomic performances of Mediterranean xerophytes in simulated dry green roofs. Urban Ecosyst. 13:349-363.
- [5] Molineux, C.J., Fentiman, C.H., Gange, A.C., 2009. Characterising alternative recycled waste materials for use as green roof growing media in the UK. Ecol. Eng. 35, 1507-1513.
- [6] Steila, D. and T.E. Pond. 1989. The Geography of Soils: Formation, Distribution, and Management, second ed. Rowman and Littlefield Publishers.
- [7] Dunnett, N. and N. Kingsbury. 2010. Planting green roofs and living walls. 2<sup>nd</sup> Ed. Timber Press, Cambridge, UK.
- [8] Friedrich, C.R., 2005. Principles for selecting the proper components for a green roof growing media, p. 262-273. Proc. 3rd North Amer. Green Roof Conf.: Greening Rooftops for Sustainable Communities, Washington, D.C. 4–6 May 2005. Cardinal Group, Toronto.

- [9] Alexander, R. 1996. Field guide to compost use. Composting Council, Alexandria, VA.
- [10] Nektarios, P.A., I. Amountzias, I. Kokkinou, N. Ntoulas. 2011. Green roof substrate type and depth affect the growth of the native species *Dianthus fruticosus* under reduced irrigation regimens. *HortScience* 46, 1208-1216.
- [11] Thuring, C.E., R.D. Berghage, and D.J. Bettie. 2010. Green roof plant responses to different substrate types and depths under various drought conditions. *HortTechnology* 20:395-401.
- [12] Durhman, A.K., D.B. Rowe, and C.L. Rugh. 2007. Effect of substrate depth on initial growth, coverage, and survival of 25 succulent green roof plant taxa. *HortScience* 42:588-595.

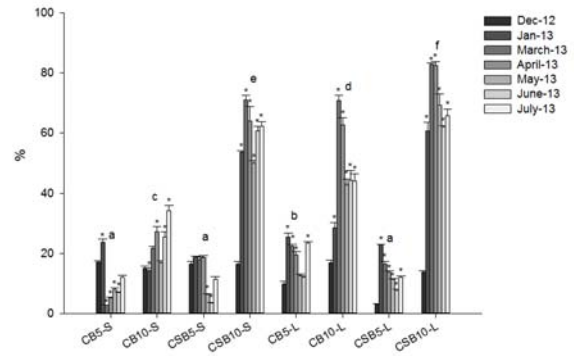
**Tables and Figures**

	pH	EC µS cm <sup>-1</sup>	Organic Matter %	WHC %	Wilting Point %	Bulk density g cm <sup>-3</sup>	Particle density g cm <sup>-3</sup>	Porosity %	Weight Kg m <sup>-2</sup> (dry soil)
Compost- bricks (1:4)	8.08 (0.12)	262 (0.22)	3.458 (0.205)	32.84 (1.35)	18.40	0.980 (0.015)	2.587 (0.004)	78.349 (0.031)	98 (10 cm) 49 (5 cm)
Compost-soil- bricks (1:1:3)	8.48 (0.04)	123 (0.45)	7.565 (0.053)	35.50 (1.51)	18.70	1.050 (0.010)	2.515 (0.001)	58.449 (0.015)	105 (10 cm) 52.50 (5 cm)

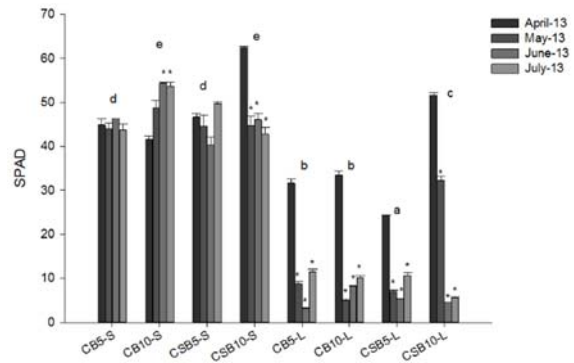
**Table 1.** Main physicochemical characteristics of two substrates tested. Values in brackets represent standard deviations.

	CB5-L	CB10-L	CSB5-L	CSB10-L	CB5-S	CB10-S	CSB5-S	CSB10-S
Hlooms index	1034 c	1174.67d	362b	1264.67d	98 a	104a	94.67a	252b
WUE	0.25 c	1.15 f	0.17bc	1.94 g	0.09ab	0.50 d	0.05 a	0.80 c
TC	39.18ab	38.75 ab	40.35bc	37.50 a	42 c	42.67c	40.79bc	40.13abc
TN	0.61 a	0.67 a	0.73 b	0.57 a	1.31 c	1.34 c	1.38 c	1.36 c
Ca	0.30bc	0.33 cd	0.25 ab	0.55 f	0.39 d	0.22 a	0.35 cd	0.45 e
K	3.33d	3.37d	2.15 ab	3.33 d	2.34 bc	2.29 bc	1.82 a	2.68 c
Mg	0.14 a	0.25 c	0.11 a	0.19 b	0.33 e	0.40 d	0.38 f	0.36 ef
Na	1.07 e	0.76 d	0.71 d	1.08 e	0.33 b	0.15 a	0.28 b	0.51 c
P	0.80 d	0.68 c	0.74 cd	0.75 cd	0.41 ab	0.39 ab	0.45 b	0.32 a
S	0.41 d	0.61 e	0.55 e	0.74 f	0.20 b	0.13 a	0.31 c	0.32 c

**Table 2.** Plant characteristics and nutrient concentrations in plant tissues measured for each specie grown in each substrate after harvest. For each variable, same letters means that there are not significant statistical differences ( $p < 0.05$ ) between substrates and between values according to Tukey-b test.



**Figure 1.** Plant coverage measured by digital image analysis. Results are expressed in percentage of the total sampling area for each sampling time. The asterisk denotes significant differences at  $p < 0.05$  level regarding the first sampling time and substrates followed by the same letter do not present significant differences ( $p < 0.05$ ) between them according to Tukey-b test. Error bars represent standard error.



**Figure 2.** Plant chlorophyll content (SPAD) measured in irrigated units. The asterisk denotes significant differences at  $p < 0.05$  level regarding the first sampling time and substrates followed by the same letter do not present significant differences between them according to Tukey-b test. Error bars represent standard error.

## Gradientes edáficos y microbiológicos en balsas mineras de la Sierra de Cartagena-La Unión

I. Párraga-Aguado<sup>(1)</sup>, M.N. González-Alcaraz<sup>(1,3)</sup>, J. Álvarez-Rogel<sup>(1)</sup>, F.J. Jiménez-Cárceles<sup>(2)</sup>, H.M. Conesa<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria, Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena España. isabel.parraga@upct.es

<sup>(2)</sup> Tecoma Ingeniería y Ambiente S.L. C/Acislo Díaz, N°9 4°K. 30005 Murcia (España)

<sup>(3)</sup> (*current address*) Department of Ecological Science, Faculty of Earth and Life Sciences, VU University of Amsterdam. De Boelelaan 1085, 1081 HV Amsterdam (The Netherlands)

### RESUMEN

Las balsas de lodos de flotación, resultado de la actividad minera en la Sierra de Cartagena-La Unión, suponen un riesgo de contaminación para el entorno y los seres humanos debido a las elevadas concentraciones de metal(oid)es que contienen. Las técnicas de ‘fitoestabilización’ aparecen como una alternativa viable a las técnicas convencionales de recuperación de suelos contaminados. El objetivo de este estudio fue describir los gradientes edáficos y microbiológicos presentes en una balsa minera abandonada de la Sierra de Cartagena-La Unión, con el fin de plantear medidas para su fitoestabilización. Para ello, se realizó un muestreo de suelo a lo largo de un transecto desde una zona no contaminada hasta el interior de la meseta de la balsa. Los principales parámetros que determinaron inicialmente la distribución de la vegetación espontánea en la balsa fueron la conductividad eléctrica y el pH, mientras que la concentración de metal(oid)es jugó un papel secundario.

**Palabras clave:** fitoestabilización; metal(oid)es; vegetación espontánea

### 1. Introducción

Las balsas o pantanos de lodos de flotación presentes en la Sierra de Cartagena-La Unión constituyen uno de los principales impactos generados por la intensa actividad minera que ha sufrido la zona. Los problemas ambientales asociados a la presencia de dichas balsas se deben a la dispersión de partículas con elevada concentración de metal(oid)es por el viento, el colapso de la estructura, la generación de drenajes ácidos y el transporte de sedimentos contaminados por las aguas de escorrentía a través de la red natural de drenaje hasta zonas topográficamente más bajas [1].

Las técnicas de ‘fitoestabilización’ (empleo de vegetación para estabilizar suelos contaminados) se presentan como una alternativa viable a las técnicas convencionales de recuperación de suelos contaminados, pero su puesta a punto requiere una mejor comprensión de los factores edáficos y ecológicos que condicionan el establecimiento de la vegetación en suelos degradados.

Las balsas de lodos de flotación presentan unas características que dificultan el establecimiento de la vegetación: ausencia de estructura, pHs extremos, baja capacidad de retención de agua y nutrientes, escaso contenido en materia

orgánica, elevada concentración de metal(oid)es. A pesar de esto, algunas especies vegetales (pioneras) son capaces de crecer sobre estos materiales y desencadenar un proceso de sucesión natural [2].

El objetivo del trabajo fue caracterizar los gradientes edáficos y microbiológicos asociados a la distribución y características de la vegetación espontánea en una balsa minera abandonada de la Sierra de Cartagena-La Unión, con el fin de determinar los factores edáficos limitantes que condicionan su establecimiento.

### 2. Materiales y Métodos

#### 2.1 Zona de estudio

El estudio se llevó a cabo en una balsa minera de la sierra de Cartagena-La Unión ubicada en el Parque Natural de Calblanque, Monte de las Cenizas y Peña del Águila.

Se realizó un muestreo de suelo a lo largo de un transecto desde una zona no contaminada hasta el interior de la balsa, distinguiendo diferentes zonas: zona control (B-C), bosque externo (B-EXT), bosque interno (B-INT), talud inferior (T-INF), talud superior (T-SUP), costra (CST), meseta sin grietas (M-SG), meseta con grietas (diferenciando entre muestras arenosas, M-G-

AR, y limosas, M-G-LM) e islas de vegetación (ISLAS) (Figura 1).

## 2.2 Caracterización del gradiente edáfico y microbiológico

Se tomaron de 3 a 4 muestras por zona del transecto. Los análisis físico-químicos realizados sobre las muestras de suelo fueron los siguientes: pH y conductividad eléctrica (CE) en el extracto 1:5, porcentaje de  $\text{CaCO}_3$  equivalente (calcímetro de Bernard), granulometría (densímetro de Bouyoucos), iones en el extracto 1:5, nitrógeno total (NT, método Kjeldahl), carbono orgánico total (CO, oxidación por dicromato potásico), carbono orgánico disuelto (COD, extracto 1:5), concentración total de metal(oid)es (fluorescencia de Rayos X) y metal(oid)es extraíbles en  $\text{H}_2\text{O}$  (extracto 1:5).

Además, para evaluar el gradiente microbiológico se determinaron el carbono de la biomasa microbiana (CBM, método de extracción-fumigación [3]) y la actividad deshidrogenasa [4].

## 3. Resultados y Discusión

El pH fue similar a lo largo del gradiente estudiado (Figura 2), excepto en el caso de la costra ácida, donde fue más bajo ( $\sim 4,5$ ), explicándose así el menor porcentaje de  $\text{CaCO}_3$  y las altas concentraciones de metales y arsénico extraíbles en esta zona (Tabla 2). Los valores CE estuvieron entre 2,5 y 5  $\text{dS m}^{-1}$ , a excepción de las muestras limosas de la zona con grietas (M-G-LM), donde se alcanzaron hasta 12  $\text{dS m}^{-1}$  (Figura 2). Las islas mostraron una CE significativamente menor al resto de las muestras de la balsa.

El nitrógeno y carbono orgánico totales mostraron una dinámica similar a lo largo del gradiente (Figura 3), con valores muy bajos en las muestras de la balsa. Las islas mostraron un valor intermedio entre los más bajos que se encontraron en la balsa y los máximos que se encontraron en el bosque control y el borde externo. Los parámetros microbiológicos analizados mostraron una alta correlación con los contenidos en materia orgánica del suelo: mayores en bosque control y borde externo.

En cuanto al contenido total de metales y arsénico, el bosque control mostró en general los valores más bajos (Tabla 1). A partir del borde externo, el contenido de metal(oid)es aumentó, pero sin seguir un patrón de variación a lo largo del transecto. Los máximos se dieron indistintamente en el talud (Zn), la costra (Pb y

As) o la meseta (Mn). Los contenidos máximos de As, Pb y Zn encontrados en las muestras de la balsa superaron los niveles genéricos de referencia (NGRx100) determinados en zonas cercanas a la Sierra Minera [5].

Las muestras de la balsa (con excepción de la costra) mostraron valores muy bajos de metal(oid)es extraíbles. El valor máximo de As extraíble se observó en el bosque control, debido posiblemente al mayor pH [6]. Las concentraciones de Pb y Cu extraíbles fueron mayores en el bosque control, borde externo e ISLAS que en el resto de zonas. Esto se puede deber a la alta afinidad que existe entre estos metal(oid)es y la materia orgánica del suelo [7].

El Análisis de Componentes Principales (PCA) (Figura 5) reveló la existencia de dos gradientes principales: uno relacionado con el contenido extraíble de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  (salinidad) y otro relacionado con el nitrógeno total (NT), el carbono orgánico (CO) y los parámetros microbiológicos. El gradiente de salinidad estaría condicionado por características propias de los residuos que conforman la balsa y podría tener influencia en la distribución de la vegetación oportunista (sucesión primaria). El gradiente de fertilidad sería consecuencia de los cambios en el suelo que produce la presencia de la vegetación existente y por tanto tendría influencia en etapas más avanzadas de la sucesión [8].

## 4. Conclusiones

El estudio edáfico y microbiológico del gradiente considerado ha permitido determinar que la presencia y distribución de la vegetación en la balsa podría estar relacionada inicialmente con la salinidad y el pH, y no tanto por el contenido en metal(oid)es. Además, la existencia de zonas muy salinas o de pH ácido aumenta la heterogeneidad ya de por sí elevada de estos ambientes. Esto habría que tenerlo en cuenta a la hora de plantear labores de fitoestabilización tales como la adición de enmiendas que puedan elevar la conductividad eléctrica o el laboreo en superficie.

## 5. Agradecimientos

Este proyecto ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad y FEDER (CTM2011-23958) y la Fundación Séneca de la Región de Murcia (15296/PI/10). El Doctor Héctor M. Conesa agradece al Ministerio de Economía y Competitividad y a la Universidad

Politécnica de Cartagena por la financiación a través del Programa Ramón y Cajal (Ref. RYC-2010-05665). María Nazaret González-Alcaraz disfruta de una beca post-doctoral de la Fundación Ramón Areces.

**6. Referencias bibliográficas**

[1] 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.

[2] Conesa H.M., García G., Faz A., Arnaldos R. 2007. Dynamics of metal tolerant plant communities' development in mine tailings from the Cartagena-La Unión Mining District (SE Spain) and their interest for further revegetation purposes. *Chemosphere* 68: 1180-1185.

[3] Vance E.D., Brookes P.C., Jenkinson D.S. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol Biochem* 19: 703-707.

[4] García C., Hernández T., Costa F., Ceccanti B., Masciandaro G. 1993. The dehydrogenase activity of soil as an ecological marker in processes of perturbed system regeneration. En: Gallardo-Lancho, J. (Ed.), *Proceedings of the XI International Symposium of Environmental Biogeochemistry*. Salamanca, España. Págs: 89-100.

[5] Martínez-Sánchez M.J., Pérez-Sirvent C. 2007. Niveles de fondo y niveles genéricos de referencia de metal(oid)es pesados en suelos de la Región de Murcia. Universidad de Murcia y Consejería de Desarrollo Sostenible y Ordenación del Territorio de la Región de Murcia. Murcia, Spain.

[6] Smith E., Naidu R., Alston A.M. 1998. Arsenic in the soil environment: a review. *Adv Agron* 64: 149-195.

[7] Khokhotva O., Waara S. 2010. The influence of dissolved organic carbon on sorption of heavy metals on urea-treated pine bark. *J Hazard Mater* 173: 689-696.

[8] 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. *Env Poll* 176: 134-143.

misma columna indican diferencias significativas entre zonas (p<0,05).

Zona	Metal(oid)es extraíbles en H <sub>2</sub> O (mg kg <sup>-1</sup> )													
	As	Cd	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	As	Cd	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
B-C	0,086±0,006	a <0,01	* 0,086±0,071	b 0,097±0,075	b 0,014±0,006	b 0,042±0,027	b 0,127±0,082	c						
B-EXT	0,025±0,002	bc <0,01	* 0,057±0,011	b 0,077±0,013	b <0,01	* 0,026±0,004	b 0,242±0,035	bc						
B-INT	<0,01	* <0,01	* <0,01	* 0,127±0,046	b <0,01	* <0,01	* 0,239±0,019	bc						
T-INF	<0,01	* 0,010±0,003	b <0,01	* 0,084±0,015	b <0,01	* <0,01	* 0,523±0,067	b						
T-SUP	<0,01	* <0,01	* <0,01	* 0,039±0,003	b <0,01	* <0,01	* 0,134±0,035	bc						
CST	0,064±0,029	ab 1,048±0,201	a 1,155±0,295	a 626,298±199,20	a 1,074±0,411	a 2,607±1,740	a 234,611±61,59	a						
M-SG	0,011±0,002	c <0,01	* <0,01	* 0,111±0,022	b <0,01	* <0,01	* 0,105±0,024	bc						
M-CG-AR	0,011±0,002	c <0,01	* <0,01	* 0,091±0,027	b <0,01	* <0,01	* 0,156±0,063	bc						
M-CG-LM	0,017±0,004	bc <0,01	* <0,01	* 0,080±0,010	b <0,01	* <0,01	* 0,110±0,083	bc						
ISLA	0,031±0,014	bc <0,01	* 0,069±0,033	b 0,207±0,066	b <0,01	* 0,049±0,045	b 0,097±0,054	bc						

Zona	Metal(oid)es totales (mg kg <sup>-1</sup> )													
	As	Cd	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	As	Cd	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
B-C	60±3	c 9±3	a 55±2	d 2,370±95	c 35±2	a 1,315±165	f 675±100	e						
B-EXT	555±50	b 34±11	a 110±10	abc 9,820±215	a 33±1	a 6,490±290	bc 8,660±280	a						
B-INT	645±80	b 34±3	a 125±8	ab 10,140±270	a 27±1	a 5,065±590	cd 7,370±760	ab						
T-INF	480±70	b 38±11	a 120±6	abc 8,740±500	a 29±4	a 9,555±900	bc 10,780±655	a						
T-SUP	695±190	b 16±6	a 100±4	abc 9,745±1,610	a 24±2	ab 3,840±515	cde 5,830±530	abc						
CST	2,290±590	a 13±7	a 135±7	a 5,020±1,540	bc 17±1	b 19,835±3,721	a 3,210±880	d						
M-SG	635±90	b 17±6	a 100±10	bc 10,305±1,105	a 27±1	a 3,070±475	de 3,880±550	cd						
M-CG-AR	515±40	b 9±3	a 90±7	c 12,280±1,115	a 29±3	a 2,685±145	e 3,880±245	cd						
M-CG-LM	370±35	b 6±0	a 110±10	abc 7,790±980	ab 27±2	a 3,005±455	de 3,040±230	d						
ISLA	700±35	b 23±8	a 95±1	bc 10,060±1,110	a 28±2	a 2,875±240	de 4,355±285	bcd						

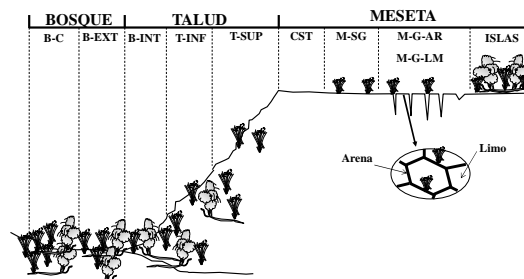
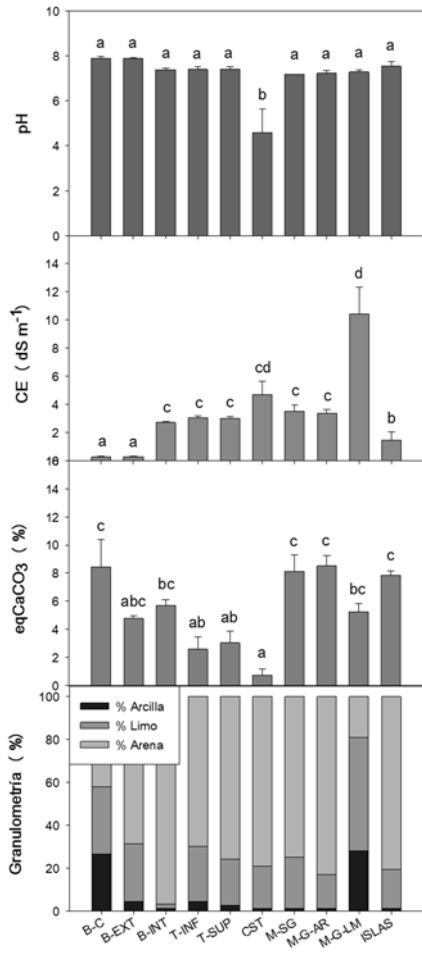


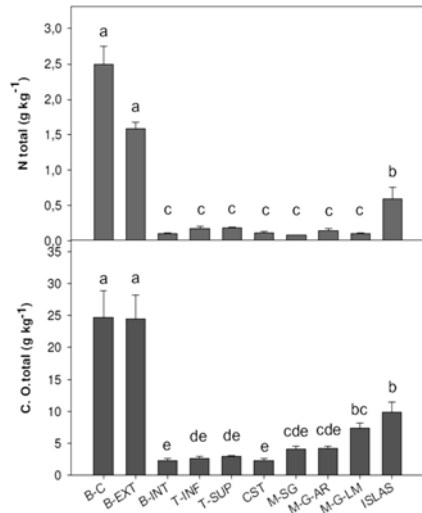
Figura 1. Esquema del transecto muestreado en el que se indican las diferentes zonas consideradas.

**Tablas y Figuras**

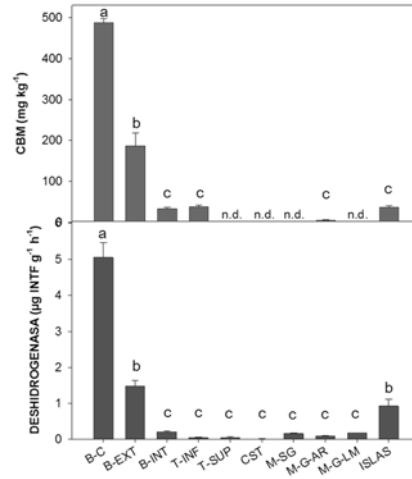
**Tabla 1.** Concentración de metal(oid)es extraíbles en H<sub>2</sub>O y metal(oid)es totales de las muestras de suelo. Letras diferentes en la



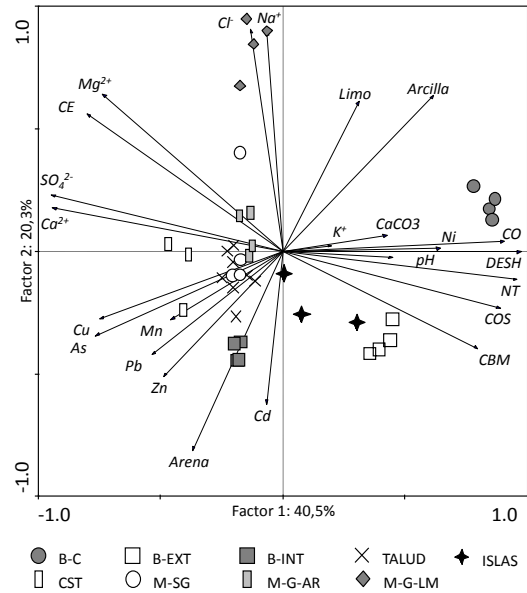
**Figura 2.** pH, CE, CaCO<sub>3</sub> y granulometría de las muestras de suelo. Diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas entre zonas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.** Nitrógeno total y carbono orgánico total de las muestras de suelo. Diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas entre zonas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4.** Carbono de la biomasa microbiana y actividad deshidrogenasa de las muestras de suelo. Diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas entre zonas ( $p < 0,05$ ). 'n.d.' = no detectado.



**Figura 5.** Análisis PCA de las muestras y los parámetros edáficos y microbiológicos.

## Protective effects of arbuscular mycorrhizae on laurustinus plants irrigated with treated wastewater under field conditions

MJ. Gómez-Bellot<sup>(1)</sup>, MF. Ortuño<sup>(2)</sup>, P. Nortes<sup>(1)</sup>, J. Vicente- Sánchez<sup>(2)</sup>, MJ. Sánchez-Blanco<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Departamento de Riego. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CSIC). P.O. Box 164, E-30100 Murcia, España. mjgb@cebas.csic.es

<sup>(2)</sup> SYMBORG.SL. Campus de Espinardo 7. Edificio CEEIM. CP30100. Murcia. España

### RESUMEN (Calibri 10p BOLD)

The combined effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and two kinds of reclaimed water was evaluated on the physiological behavior, leaf nutrition and aesthetic value of laurustinus plants. AMF satisfactorily colonized the laurustinus roots, enhanced the structure of soil, increased beneficial nutrients and decreased toxic ions in leaves, stimulated flowering and enhanced the water status of the plants irrigated with reclaimed water. AMF not only ameliorated the negative effects of reclaimed water with high salinity, but also had a positive effect in well watered plants.

**Palabras clave:** salinity; *Glomus iranicum*; soil properties; ornamental plants.

### 1. Introduction

Currently, the overexploitation of available water resources and other environmental factors are leading to an increase in soil salinization [1]. Particularly in the Mediterranean area, protected horticultural and ornamental crops have to cope with the increasing salinization of irrigation water and soil, because of the intensive use of scarce water resources [2]. This suggests an urgent need to explore new alternative water resources such as reclaimed water to satisfy the crop water requirements. Reclaimed water usually contains a great concentration of nutrients that produce a direct benefit for crops. However, depending upon its source and treatment, reclaimed water may have high salt content, heavy metals or pathogenic organisms. In general, as salinity increases in the treated wastewater used for irrigation, the probability of crop problems increases.

Many researchers have shown that arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) have a positive influence on cultivation systems [3]. They not only improve plant growth through increased nutrient uptake, but they also have 'non –nutritional' effects in stabilizing soil aggregates, in preventing erosion, and in alleviating the negative effects induced by salinity. AMF are able to develop several mechanisms to enhance the salt tolerance of host plants such as increased nutrient acquisition, maintenance of the K/Na ratio,

biochemical changes, physiological changes and molecular or structural changes [4].

Although salinity may reduce the colonization capacity and the growth of fungal hyphae [5] some authors have demonstrated that mycorrhizal inoculation can alleviate the negative effects produced by saline irrigation in ornamental and wild plants [2, 6].

In this study, we evaluated the combined effect of arbuscular fungi inoculation and two kinds of reclaimed water with different electrical conductivity on the ion acquisition, water status, gas exchange and aesthetic value of *Viburnum tinus* plants, as well as the effect of reclaimed water on mycorrhizal root colonization and soil properties.

### 2. Materials and Methods

The experiment was performed on a one-year-old laurustinus (*Viburnum tinus* L.) (n=80) at the experimental farm of CEBAS- CSIC in Santomera (Murcia, Spain), using a planting pattern of approximately 1 m x 0.80 m.

On April 2012, laurustinus plants were collected from a nursery and were transplanted into the experimental plot. The soil was amended initially with 2 g L<sup>-1</sup> of Osmocote Plus and every 3-4 months, a Hoagland solution (standard nutrient solution) were supplied through the drip irrigation system. The plants were irrigated twice



a day and the volumetric water content ( $\theta_v$ ) of the soil profile was measured by time domain reflectometry (TDR).

On 5 April 2013, the first saline period started with two irrigation treatments which consisted of a Control ( $EC < 0.9 \text{ dS m}^{-1}$ ) and a reclaimed wastewater, RW ( $EC: 4 \text{ dS m}^{-1}$ ) from a sewage treatment plant located in Campotejar (Murcia, Spain). Plants were irrigated so that the stem water potential of the Control plants did not exceed  $-0.8 \text{ MPa}$  and depending on the season, climatic conditions and plant development. For each irrigation treatment, twenty plants were inoculated with *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* sp. *Nova*. Therefore there were four treatments in total: Control and RW treatments with and without mycorrhizal inoculation.

On 20 June 2013, the second saline period started with Control water and with a reclaimed wastewater, RW ( $EC: 6 \text{ dS m}^{-1}$ ) from another sewage treatment plant located in Mazarrón (Murcia, Spain). The second saline period ended on 18 December 2013.

#### 2.1 Root colonization and enzymatic mycorrhizal activity

At the beginning and at the end of the experiment, the percentage of mycorrhizal root colonization was estimated in three roots per treatment following the gridline intersect method [7].

#### 2.2 Soil and leaf analyses

At the end of the first saline period and at the end of the experiment, the mineral content of three soil samples and the mineral content of four leaves per treatment were determined by Inductively Coupled Plasma optical emission spectrometer (ICP-OES IRIS INTREPID II XDL). Chloride concentration was analysed by a chloride analyzer (Chloride Analyser Model 926, Sherwood Scientific Ltd.). The total-N (NT), total-C (CT) and organic- C ( $C_{org}$ ) concentrations of the soil were also measured with an elemental analyser Flash EA 1112 Series- Leco Truspec. The OM content was determined by multiplying  $C_{org}$  by 1.72. Available-P was also analysed colorimetrically as molybdovanadophosphoric acid [8].

At the end of the first saline period the easily extractable glomalin (EEG), were determined in three soil samples per treatment by the Bradford method with bovine serum albumin as standard [9].

#### 2.3. Growth parameters, water status and gas exchange.

At the end of the experiment, all the plants were visually evaluated as follows: (1) PIC, percentage of plants in ideal condition; (2) PAC, percentage of plants in acceptable condition; (3) PDB, percentage of plants with dry branches; and (4) DP, percentage of dry plants. The number of flowers per plant was counted at the end of the second saline period.

Throughout the experiment, stem water potential ( $\Psi_{stem}$ ) was estimated on seven leaves per treatment, previously covered with aluminium foil and measured at noon with a Scholander pressure chamber. Leaf stomatal conductance ( $g_s$ ) and net photosynthetic rate ( $P_n$ ) were determined on seven leaves per treatment at noon, using a gas exchange system (LI-6400; LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA).

### 3. Results and discussion

The Inoculated plants for Control and RW treatments presented higher percentage of root colonization than non-inoculated plants. Nevertheless, for non- inoculated plants, these percentages presented relatively high levels, probably due to a native AMF proliferation, percentage that increased at the end of the second saline period (Table 1). On the other hand, only AMF colonization in inoculated RW plants decreased at the end of the second saline period respect to the end of the first saline period. Therefore, Na and Cl content present in the soil of the plants irrigated with RW could affect negatively the mycorrhizal colonization [4].

As regards inoculated plants, our results confirm that *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* sp. symbiosis was well established on laurustinus roots regardless of the type of water used.

In addition, the high content of the EEG observed in inoculated soils (Table 2) could be related to the higher content of  $C_{org}$  and OM, and the tendency of  $N_t$  to increase in inoculated soils respect to non-inoculated soils (Table 2) [10] creating stable aggregates.

**Table 1** Percentage of initial (IC) and final (FC) root colonization

Mycorrhizal Parameters	Treatments			
	C	C M	RW	RW M

<b>IC (%)</b>	59±1 b	84±5 a	62± 2 b	81±2 a	***
<b>FC (%)</b>	85±1 c	91± 3 a	69± 1 d	76±1 b	***

\*, \*\*, \*\*\*, and ns indicate the level of significance at P<0.05, 0.01, 0.001 and the absence of significance, respectively, according to Duncan's multiple range test.

**Table 2.** Effects of the irrigation water and AMF on the chemical properties and the easily extractable glomalin in soil (EEG) at the end of the first saline period

Mycorrhizal Parameters	Water		AMF			
	C	RW	+	-		
Available- P	15.89	11.31 **	13.34	13.61 ns	ns	
NT (g/100g)	0.15	0.13 ns	0.15	0.13 ns	ns	
CT (g/100g)	7.15	7.71 ns	7.62	7.24 ns	ns	
C <sub>org</sub> (g/100g)	1.36	1.36 ns	1.42	1.31 *	ns	
OM (%)	2.34	2.34 ns	2.43	2.25 *	ns	
C/N	9.49	10.28 ns	9.81	9.96 ns	ns	
EEG (mg g <sup>-1</sup> soil)	38.26	22.43 ***	38.14	22.55 ***	***	

\*, \*\*, \*\*\*, and ns indicate the level of significance at P<0.05, 0.01, 0.001 and the absence of significance, respectively, according to Duncan's multiple range test.

Leaf K content was decreased by AMF. However, the fungal activity enhanced the phosphorus as well as magnesium nutrition of plants and alleviated the adverse effect of salinity suppressing toxic ions such as Na (table 3) [11].

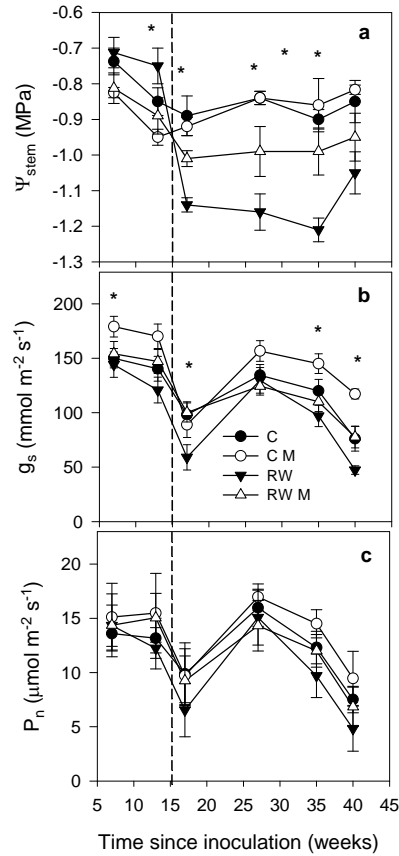
**Table 3.** Effects of irrigation water and AMF on the mineral content at the end of the experiment

Leaf analyses (mg kg <sup>-1</sup> DW)	Water		AMF			
	C	RW	+	-		
Cl	4475	12200 ***	7850	8825 *	ns	
Na	202	1771 ***	743	1230 ***	***	
Ca	12584	14995 ***	13600	13979 ns	**	
Mg	4651	4152 ***	4571	4233 ***	***	
P	1746	1458 ***	1702	1502 ***	ns	
K	12020	15203 ***	13028	14195 ***	ns	
B	197	202 *	202	205 *	***	

\*, \*\*, \*\*\*, and ns indicate the level of significance at P<0.05, 0.01, 0.001 and the absence of significance, respectively, according to Duncan's multiple range test.

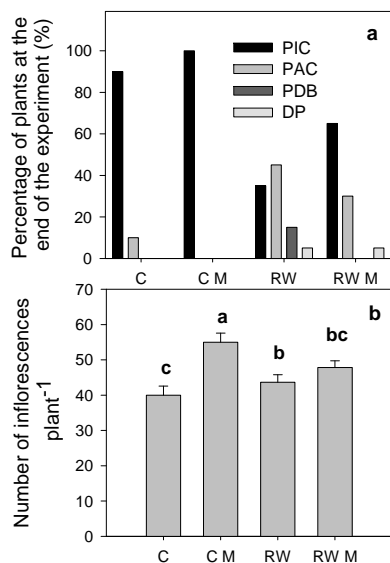
The decrease in  $\Psi_{stem}$  of RW plants from week 14, as a result of the increase of EC in soil, and their high volumetric content (data not shown) in soil suggested that salts dissolved in reclaimed water caused difficulty for roots in absorbing water from the soil (Fig. 1). However, the mycorrhizal

inoculation improved the stem water potential and improved slightly stomatal conductance of inoculated RW plants respect to the non-inoculated plants, with the beneficial effects of AMF becoming more visible at the end of the second saline period, when the level of stress increased (Fig. 1) [12].



**Figure 1.** Stem water potential ( $\Psi_{stem}$ ) (a), stomatal conductance ( $g_s$ ) (b) and photosynthesis rate ( $P_n$ ) (c) of *laurustinus* plants during the experiment.

Although there were no significant differences in the photosynthesis rate between treatments, at the end of the saline period, inoculated Control plants showed 100% of PIC, followed by non-inoculated Control plants, with 90% of PIC (Fig. 2). The lowest PIC values were found in non-inoculated RW plants, (35% of PIC and 5% of DP) probably due to salts reducing the chlorophyll content in leaves which resulted in leaf chlorosis. On the other hand, AMF produced 65% of PIC and 35% of PAC in RW plants. The number of flowers was also increased by the mycorrhizal inoculation, reaching in the inoculated Control plants the highest number of inflorescences per plant (Fig. 2). Similar results were found by Navarro et al. (2012) [2].



**Figure 2.** Percentage of plants according to the visual characteristic of *laurustinus* plants (a) and number of inflorescences per plant (b)

#### 4. Conclusions

The salts dissolved in the RW induced a difficulty in taking water from the soil and osmotic stress which provoked a considerable percentage of plants with chlorotic leaves. In spite of the development of native AMF, the results suggested that the inoculation of *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* sp. *Nova* improved the aesthetic value of the *laurustinus* plants in both irrigation conditions, enhancing the structure of soil, increasing beneficial nutrients and decreasing toxic ions, stimulating flowering and enhancing the  $g_s$  rates. AMF not only ameliorated to a certain extent the negative effects of reclaimed water with high salinity, but also had a positive effect in well watered plants.

#### 5. Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (AGL 2011-30022-C02-01-02) and Fundación Séneca (15356/PI/10).

#### 6. References

[1] Aroca R., Ruiz-Lozano J.M., Zamarreno A.M., Paz J.A., García-Mina J.M., Pozo M.J., Lopez-Raez J.A. 2013. Arbuscular mycorrhizal symbiosis influences strigolactone production under salinity and alleviates salt stress in lettuce plants. *J. Plant Physiol.* 170: 47–55.

[2] Navarro A., Elia A., Conversa G., Campi P., Mastrorilli M. 2012. Potted mycorrhizal carnation plants and the saline stress: Growth, quality and nutritional plant responses. *Sci Hort.* 140: 131-139.

[3] Hamel, C., Plenchette, C. 2007. *Mycorrhizae in Crop Production.* Haworth Press, Binghamton, NY.

[4] Sheng M., Tang M., Chen H., Yang B., Zhang F., Huang Y. 2008. Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza* 18: 287-296.

[5] Jahromi F., Aroca R., Porcel R., Ruiz-Lozano J.M. 2008. Influence of salinity on the in vitro development of *Glomus intraradices* and on the in vivo physiological and molecular responses of mycorrhizal lettuce plants. *Microb. Ecol.* 55: 45-53.

[6] Kumar A., Sharma S., Mishra S. 2010. Influence of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi and salinity on seedling growth, solute accumulation, and mycorrhizal dependency of *Jatropha curcas* L. *J. Plant Growth Regul.* 29: 297–306.

[7] Giovannetti M., Mosse B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular–arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84: 489–499.

[8] Watanabe F.S., Olsen S.R. 1965. Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and NaHCO<sub>3</sub> extracts from soils. *Soil Sci. Soc. Am. Pro.* 29: 677-678.

[9] Wright S.F., Franke–Snyder M, Morton J.B., Upadhyaya A. 1996. Time–course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. *Plant Soil* 181: 193–203.

[10] Treseder K.K., K.M. Turner. 2006. Glomalin in ecosystems. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 71:1257–1266.

[11] Talaat, N.B., Shawky, B.T., 2014. Protective effects of arbuscular mycorrhizal fungi on wheat (*Triticum aestivum* L.) plants exposed to salinity. *Environ. Exp. Bot.* 98: 20-31.

[12] Mardukhi B., Rejali F., Daei G., Ardakani M.R., Malakouti M.J., Miransari M. 2011. Arbuscular mycorrhizas enhance nutrient uptake in different wheat genotypes at high salinity levels under field and greenhouse conditions. *C. R. Biol.* 334: 564–571.

## Influencia de distintos manejos del suelo sobre la actividad edáfica, la materia orgánica y la producción de una finca de ciruelo ecológico en el área mediterránea

C. Chocano <sup>(1)</sup>, T. Hernández <sup>(1)</sup>, D. González <sup>(2)</sup>, J. Melgares de Aguilar <sup>(2)</sup>, C. García <sup>(1)</sup>

<sup>1</sup> CEBAS. CSIC. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura. Apartado 164. 30.100, Espinardo, Murcia. cchocano@cebas.csic.es

<sup>2</sup> Consejería de Agricultura y Agua. Plaza Juan XXIII s/n. 30.071 Murcia.

### RESUMEN

El objetivo de este estudio es analizar la influencia de distintos manejos orgánicos del suelo sobre la fertilidad del mismo, su actividad biológica y la producción en una finca de ciruelo ecológico situada en la cuenca mediterránea. Los tratamientos realizados han sido cuatro. La reincorporación al suelo de la vegetación espontánea y restos de poda triturados, el aporte de compost, el aporte de un biofertilizante y la siembra de abono verde mezcla de leguminosa y gramínea. Se han analizado parámetros relacionados con la materia orgánica del suelo (carbono orgánico total), la vida microbiana (carbono de la biomasa y respiración) y un parámetro agronómico (producción de ciruela). Los resultados confirman que es una finca autosuficiente que conserva e incrementa su fertilidad, siendo las parcelas con aporte de compost las que obtienen un mayor contenido en materia orgánica de calidad que proporciona una mayor actividad microbiana edáfica; así como una mayor producción de los árboles; mientras que con el abono verde se estimula enormemente la vida microbiana aunque la producción de ciruela se resiente.

**Palabras clave:** compost ecológico; abono verde, *Azospirillum brasilense*; actividad microbiana; autosuficiencia

### 1. Introducción

Una cierta proporción de la materia orgánica del suelo se mineraliza cada año, esta mineralización se acelera en la zona mediterránea debido a las condiciones climáticas (temperatura, humedad) y a la excesiva aireación del suelo causada por el laboreo. Esta cantidad que se pierde debería ser compensada por el retorno de nueva materia orgánica.

Aún sigue siendo incierto hasta que punto el suelo agrícola en una finca ecológica puede ser más o menos dependiente de los insumos orgánicos exógenos, y cual es su capacidad de auto-suficiencia en el mantenimiento del equilibrio de la biomasa, es decir el equilibrio entre la salida representada como la productividad de los cultivos y la entrada o reincorporación de los residuos orgánicos.

Hay poca información disponible sobre estudios comparativos de la productividad de un cultivo y la calidad del suelo dentro de las diferentes prácticas orgánicas [1]; mientras que abundan los estudios e investigaciones asociados con las

diferencias entre prácticas convencionales y ecológicas [2,3].

Ya se sabe que la aplicación de materia orgánica compostada al suelo proporciona unos efectos positivos sobre la calidad del suelo, en sus características físicas, químicas, microbiológicas, así como en la nutrición de las plantas [4]; así mismo, algunos autores [5] afirman que algunos biofertilizantes pueden ser sustitutivos de la fertilización convencional soluble sin que se produzcan mermas en la producción y con una reducción notable en el nivel de nitratos en suelo y planta; aunque otros [6] restringen los efectos beneficiosos de ciertas rizobacterias y hongos micorrízicos a las propiedades del suelo sin diferencias significativas en las producciones.

El uso del abono verde se considera una importante técnica agronómica en cultivos mediterráneos para mejorar la calidad del suelo y la producción de cultivos [7]. Son conocidos los beneficios del abono verde: la reducción de la dependencia de los fertilizantes minerales y el mantenimiento de la materia orgánica en el suelo para proporcionar nutrientes para el crecimiento

vegetal [8] y el aumento del tamaño y la actividad de las comunidades microbianas del suelo [9].

Por esto, el principal objetivo de este trabajo es estudiar la influencia de distintos manejos orgánicos del suelo, propuestos por las normas de agricultura ecológica, sobre la producción del ciruelo y la repercusión en la calidad y la materia orgánica del suelo medida a través de indicadores microbiológicos. Estos efectos se han estudiado durante seis años

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Area de estudio

El estudio se ha realizado entre los años 2008 y 2013 en Cieza, Murcia (España); en una finca de agricultura ecológica desde el 2002 situada en la orilla del río Segura. El cultivo es ciruelo variedad Santa Rosa y polinizadores Golden Japan, árboles de diez años en el inicio del ensayo y marco de plantación 4x4. Por ser zona de riego tradicional se riega a manta. El suelo es Fluvisol-calcárico con una textura franco arenosa gruesa y un contenido en materia orgánica al inicio del ensayo de 0,95%. El clima es semiárido mediterráneo.

### 2.2 Diseño experimental y tratamientos

Las parcelas experimentales son de 256 m<sup>2</sup> (16 árboles), con tres bloques y los tratamientos distribuidos al azar: i) incorporación al suelo, mediante una labor de cultivador, de la vegetación espontánea, hojas, hierbas y restos de poda triturados (sobre 9-10 kg madera/árbol y año). (Spontaneous vegetation: SV); ii) aplicación anual de un biofertilizante comercial granulado compuesto de una mezcla de *Azospirillum brasilense* y *Pantoea dispersa*, en febrero, 30- 40 días antes de la floración y dosis de 0,75 kg/árbol. (Biofertilizer: B); iii) aporte anual de 32 kg/árbol de compost ecológico de oveja. (Compost: C) aplicado en noviembre y enterrado superficialmente con una labor de cultivador y iv) siembra anual de abono verde (60% gramínea, 40% leguminosa) y dosis de siembra 120 kg/ha. La siembra se realiza después de las primeras lluvias de otoño, octubre o noviembre y se siega en primavera, al inicio de la floración, abril o mayo, y se incorpora al suelo con una labor con cultivador (Green manure: GM).

### 2.3 Parámetros analizados

Se han realizado muestreos del suelo a una profundidad de 0-25 cm y en la zona radicular del árbol, en el mes de julio, y las muestras se pasaron por un tamiz de 2 mm antes de analizar.

El C orgánico total (TOC) se determina mediante oxidación con K<sub>2</sub>CrO<sub>7</sub> en medio ácido y valoración del exceso de dicromato con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. El C de Biomasa microbiana (MBC) fue determinado por el método de fumigación-extracción (Vance et al., 1987, modificado por Widmer et al., 1989) usando un analizador automático (Shimadzu TOC5050A Total Organic Carbon Analyzer) para la determinación del C extraído con K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La respiración del suelo fue determinada usando 15 g de suelo, humedecido al 65% de su capacidad de campo, en frascos cerrados herméticamente, bajo incubación de 30 días a 28 °C. El CO<sub>2</sub> producido fue medido periódicamente usando un analizador de gases infrarrojo (Toray PG-100, Toray Engineering Co. Ltd., Japan) y la producción de ciruelas (kg/árbol) se determinó en la época de cosecha (2 cortes a mediados y finales de junio) en 24 árboles, los 8 árboles centrales de cada bloque.

Todos los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico de la varianza de una vía (ANOVA), realizado con el programa informático STATGRAPH PLUS y utilizándose el test LSD con un nivel de confianza del 95% para la diferenciación entre medias.

## 3. Resultados y Discusión

Los valores del carbono orgánico total (TOC) muestran un ascenso paulatino durante los seis años del ensayo (Fig. 1) siendo el mayor incremento con el aporte del compost seguido del abono verde. Ambos tratamientos incorporan al suelo materia orgánica y proporcionan diferencias significativas con respecto al biofertilizante y a la vegetación espontánea (Tabla 1). Considerando que la materia orgánica del suelo contiene alrededor de un 58% de carbono [10] podemos afirmar que en las parcelas con compost la materia orgánica ha aumentado del 1,1% en 2008 al 3,9% en 2013 y en las parcelas de vegetación espontánea del 0,95% al 2,12%. En todos los tratamientos el balance entre la salida y la entrada de biomasa resulta positiva.

Los datos del carbono de la biomasa (Fig. 2) nos dan la magnitud de la población microbiana presente en el suelo. Al inicio y en los últimos años el C biomasa es significativamente mayor con los aportes de compost; debido posiblemente a la estimulación de la población microbiana existente y la aportada por la propia enmienda orgánica [11]; sin embargo algunos años el abono verde y el biofertilizante han dado mayores valores que el compost, quizás por un

mayor incremento del carbono orgánico lábil fácilmente utilizable por los microorganismos. Si queremos saber que parte de esa biomasa microbiana está activa recurrimos al parámetro de la respiración basal (Fig. 3) que se encuentra correlacionado con el C biomasa [12] cuando se realizan enmiendas orgánicas al suelo. Los valores son siempre mayores y con diferencias significativas en las parcelas con compost, seguidas de las parcelas de abono verde.

Si analizamos los resultados de producción del cultivo (Fig. 4) encontramos diferencias en las producciones según los años debido a condiciones climáticas adversas (granizo, sobre todo). Aunque normalmente las mayores producciones se obtienen con el aporte de compost, algunos años (2010 y 2011) es con el simple aporte de la vegetación espontánea cuando obtenemos el mayor rendimiento del árbol. Esto puede ser debido a que con el resto de manejos orgánicos estimulamos más la población microbiana edáfica que puede causar alguna competencia por los nutrientes con el árbol. Si tomamos la producción acumulada en los seis años (Tabla 2) vemos que los mayores valores se obtienen con el aporte de compost; con un incremento del 12,5% con respecto a la producción más baja (parcelas de abono verde) y seguido por el biofertilizante; [13] también observaron el aumento de la biomasa y la cosecha de grano en sorgo con la biofertilización con *Azospirillum*.

#### 4. Conclusiones

Podemos concluir que la finca ecológica de ciruelo de este ensayo tiene capacidad de auto-suficiencia en el mantenimiento del equilibrio de su biomasa. El manejo orgánico realizado en todos los tratamientos conserva e incrementa la fertilidad del suelo, siendo las parcelas con aporte de compost las que obtienen un mayor contenido en materia orgánica de calidad que proporciona una mayor población y actividad microbiana edáfica; así como una mayor producción de los árboles; mientras que con el abono verde se estimula enormemente la vida microbiana aunque la producción de ciruela se resiente.

#### 5. Agradecimientos

Los autores desean agradecer a D. Felipe González Marín, dueño del cultivo de ciruelo ecológico, su amable ofrecimiento para realizar este proyecto en su finca.

#### 6. Referencias bibliográficas

- [1] Veum K.S., Goynes K.W., Holan S.H., Motavalli P.P. 2011. Assessment of soil organic carbon and total nitrogen under conservation management practices in the Central Claypan Region, Missouri, USA. *Geoderma*. 167-168: 188-196
- [2] Aranda V., Ayora-Cañada M.J., Domínguez Vidal A., Martín-García J.M., Calero J., Delgado R., Verdejo T., González-Vila F.J. 2011. Effect of soil type and management (organic vs conventional) on soil organic matter quality in olive groves in a semi-arid environment in Sierra Mágina Natural Park (S Spain). *Geoderma*. 164: 54-63
- [3] Araujo A.S.F., Santos V.B., Monteiro R.T.R. 2008. Responses of soil microbial biomass and activity for practices of organic and conventional farming systems in Piauí state, Brazil. *Eur J Soil Biol*. 44: 225-230
- [4] Baldi E., Toselli M., Marcolini G., Quartieri M., Cirillo E., Innocenti A., Marangoni B. 2010. Compost can successfully replace mineral fertilizers in the nutrient management of commercial peach orchard. *Soil Use Manage*. 26: 346-353
- [5] Fernando A.L., Villaverde M., Nicolás J.A., García-Gómez A., Malo A. 2008. *Pantoea dispersa*; rhizobacteria promotora del crecimiento vegetal. Actas del VIII Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica. Bullas (Murcia (Spain))
- [6] Kholer J.V., Caravaca F., Pascual J., Roldán A. 2008. Efecto de la inoculación de rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR) y hongos micorrízicos en plantas de lechuga sobre el crecimiento y la calidad del suelo. Actas del VIII Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica. Bullas (Murcia (Spain))
- [7] Mancinelli R., Marinari S., Di Felice V., Savin M.C., Campiglia E. 2013. Soil property, CO<sub>2</sub> emission and aridity index as agroecological indicators to assess the mineralization of cover crop green manure in a Mediterranean environment. *Ecol Indic*. 34: 31-40
- [8] Yadav R.L., Dwivedi B.S., Pandey P.S. 2000. Rice-wheat cropping system: assessment of sustainability under green manuring and chemical fertilizer inputs. *Field Crops Res*. 65: 15-30
- [9] Tejada M., González J.L., García-Martínez A.M., Parrado J. 2008. Effects of different green manures on soil biological properties and maize yield. *Bioresour Technol*. 99: 1758-1767

[10] Labrador J. 2002. La materia orgánica en los agrosistemas. Ediciones Mundi-Prensa

[11] Ros M., Hernández M.T., García C. 2003. Soil microbial activity after restoration of a semiarid soil by organic amendments. Soil Biol Biochem. 35: 463-469

[12] Bastida F., Moreno J.L., Hernández M.T., García C. 2007. The long-term effects of the management of a forest soil on its carbon content, microbial biomass and activity under a semi-arid climate. Appl Soil Ecol. 37: 53-62

[13] García-Olivares J.G., Moreno-Medina V.R., Rodríguez-Luna I.C., Mendoza-Herrera A., Mayek-Perez N. 2006. Biofertilización con Azospirillum brasilense en sorgo en el norte de México. Agricultura Técnica en México. 32 (2): 135-141

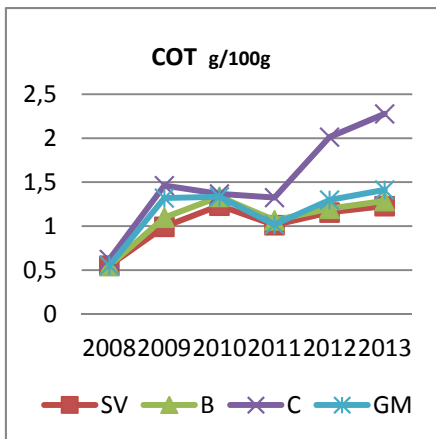
**Tablas y Figuras**

**Tabla 1. Carbono orgánico total (g/100g)**

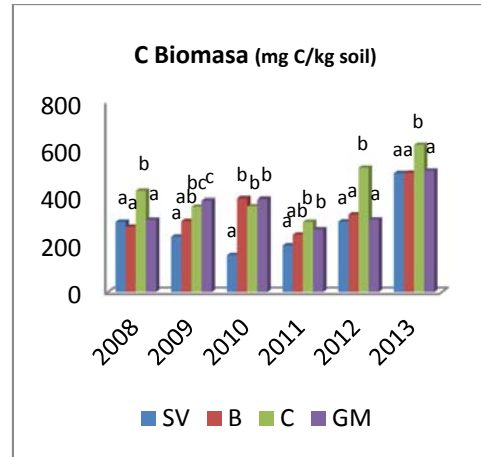
	2008	2009	2010	2011	2012	2013
SV	0,552 a	0,993 a	1,233 a	1,012a	1,155 a	1,229 a
B	0,548 a	1,098 a	1,333 a	1,066a b	1,200 a	1,287 a
C	0,622 a	1,462 c	1,367 a	1,324b	2,013 b	2,276 b
G M	0,551 a	1,320 b	1,333 a	1,017a	1,298 a	1,413 a

**Tabla 2. Producción acumulada (kg/árbol)**

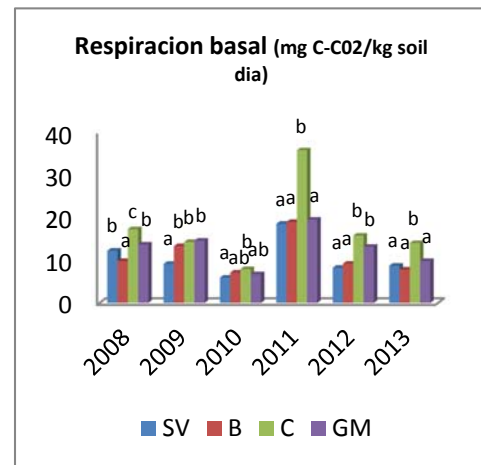
Producc acumulada	kg/árbol
SV	33,27ab
B	33,48ab
C	36,56b
GM	32,51a



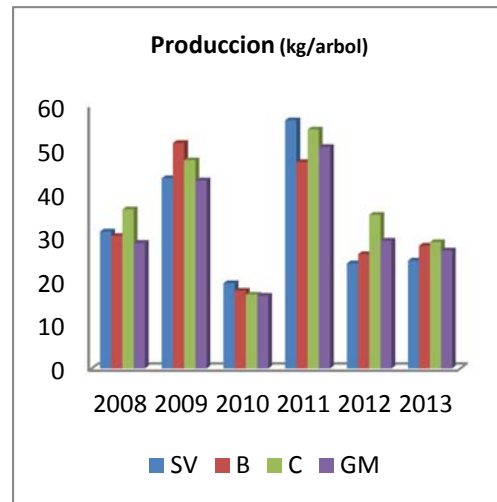
**Figura 1. Evolución del Carbono orgánico total**



**Figura 2. Carbono de la biomasa microbiana**



**Figura 3. Respiración basal**



**Figura 4. Evolución de la producción**

## Respuesta del limonero ‘Fino 49’ al riego deficitario. Efectos sobre el crecimiento, la producción y la calidad del fruto

J.M. Robles, J.G. Pérez-Pérez, P. Botía

Departamento de Citricultura, Equipo de Citricultura. Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA). 30150 La Alberca, Murcia.España.  
juanm.robles@carm.es

### RESUMEN

El limonero es uno de los cultivos más representativos en la Región de Murcia. Sin embargo, la escasez de recursos hídricos provoca que sea necesario utilizar otras técnicas de cultivo, como la aplicación de estrategias de riego deficitario para intentar optimizar los recursos hídricos disponibles. El ensayo se llevó a cabo durante dos años en una parcela experimental del IMIDA en Torre Pacheco (Murcia) en árboles de 13 años de la variedad de limonero Fino 49 injertados sobre *Citrus macrophylla* Wester. Se aplicaron dos tratamientos de riego, un tratamiento control (100 % ETc) y un tratamiento de riego deficitario (RD) al que se le suprimió el riego en dos periodos de desarrollo del fruto, P-I (fase I de división celular e inicio de fase II de desarrollo del fruto) y P-II (final desarrollo del fruto hasta la cosecha) y resto del año se mantuvo como el control. Durante los dos años de ensayo, la estrategia de riego provocó, en los periodos en los que se suprimió el riego, un déficit hídrico en el cultivo, causando una reducción de la tasa de crecimiento del tronco media de un 51 %. La cosecha disminuyó un 22 % debido a un menor peso medio del fruto (22 % menos). Respecto a la calidad del fruto, el tratamiento RD presentó frutos de menor calibre pero mayor acidez total y sólidos solubles totales en el zumo. En general, la estrategia de RD provoca un retraso del momento de recolección y una reducción de la cosecha.

**Palabras clave:** Déficit hídrico; potencial hídrico de xilema; eficiencia en el uso del agua

### 1. Introducción

El cultivo del limonero en España se sitúa en las zonas costeras del este y sur de la península, principalmente en la Región de Murcia, Comunidad Valenciana y Andalucía, donde tienen un clima semiárido, caracterizado por la escasez de lluvias y la elevada demanda evaporativa.

En la región de Murcia, la infradotación hídrica se convierte en el principal factor limitante de la producción. En estas condiciones, los cítricos presentan disminuciones importantes de los rendimientos. Los pocos recursos hídricos disponibles se pueden optimizar aplicando diferentes estrategias de riego deficitario (RD), que consiste en reducir el riego durante los estadios fenológicos que menos afecten a la producción [1] (Mitchell y col., 1986).

Para poder aplicar diferentes estrategias de RD correctamente es necesario caracterizar el grado de sensibilidad al déficit hídrico para los diferentes estadios fenológicos, siendo la floración y el cuajado del fruto, los momentos

más críticos en los cítricos [2] (Doorembos and Kassam, 1979).

El principal objetivo de este trabajo fue determinar los efectos del recorte del riego en dos periodos del ciclo de cultivo sobre el estado hídrico de la planta, crecimiento vegetativo, producción y calidad del fruto en la variedad de limonero ‘Fino 49’.

### 2. Materiales y Métodos

El ensayo se llevó a cabo durante 2 años, en una parcela experimental del IMIDA de 2 ha, ubicada en el término municipal de Torre Pacheco, en árboles de 13 años de edad, de la variedad de limonero ‘Fino 49’ injertado sobre el patrón *Citrus macrophylla* Wester con un marco de plantación de 3 × 8 m.

Se diseñó un sistema experimental unifactorial con bloques al azar (3 árboles controlados por bloque y tres bloques por tratamiento). El sistema de riego consta de dos líneas portagoteros por tratamiento, con 6 goteros autocompensantes de 4 L h<sup>-1</sup> por árbol. Se



establecieron dos tratamientos de riego, un tratamiento control (100 % ETC) y un tratamiento deficitario (RD) al que se le suprimió el riego en dos periodos de desarrollo del fruto, P-I (fase I de división celular e inicio de fase II de desarrollo del fruto) comprendido entre el 8 de mayo al 24 de junio en 2005 y del 18 de mayo al 6 de julio en 2006 y P-II (final desarrollo del fruto hasta la cosecha) comprendido entre el 5 de octubre al 21 de noviembre en 2005 y 10 de octubre al 5 de diciembre en 2006.

El potencial hídrico del xilema al mediodía ( $\Psi_x$ ) se midió mediante una cámara de presión [3] (Schölander y col., 1965), en hojas que se taparon con papel de celofán cubierto con papel de aluminio, como mínimo, 2 horas antes de medir. La medida del crecimiento del tronco se realizó a 5-7 cm por encima y por debajo de la unión del injerto, con una cinta métrica flexible de 1m y lectura  $\pm 1$  mm. La recolección se realizó en un solo corte, cuando los frutos presentaban un calibre comercial ( $> 58$  mm), pesando y contando el total de frutos recolectados de cada árbol. En el momento de la cosecha se tomaron muestras de 9 frutos representativas de cada árbol y a los frutos se les determinó el diámetro ecuatorial, la altura, el espesor de corteza y el porcentaje de corteza y de zumo. Al zumo se le determinó el contenido de sólidos solubles totales (SST) y la acidez valorable. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con el paquete STATGRAPHICS 5.1 plus.

### 3. Resultados y Discusión

Durante el periodo I, caracterizado por unas escasas precipitaciones, la supresión del riego en el tratamiento RD provocó un descenso significativo del  $\Psi_x$ , alcanzando en el momento de máximo estrés un valor de  $-1,90$  MPa en 2005 y  $-2,11$  MPa en 2006 (figura 1). Con la reanudación del riego, la rehidratación de la planta se produjo rápidamente y presentó valores de  $\Psi_x$  similares al control a los pocos días. Cuando el estrés hídrico ocurrió durante el periodo II, se alcanzó un valor mínimo de  $\Psi_x$  de  $-1,76$  MPa, tras 22 días de supresión del riego en 2005 y de  $-2,02$  MPa tras 16 días de supresión del riego en 2006 (figura 1). Posteriormente, con la presencia de lluvias, el  $\Psi_x$  se recuperó en el tratamiento RD.

El estrés hídrico acumulado en el tratamiento RD durante 2005, produjo una reducción de la tasa de crecimiento de la variedad en un 51 % y del

patrón en un 42 % (tabla 1). Resultado análogo se obtuvo en 2006.

La producción disminuyó durante ambos años, aunque sólo fue significativa en 2006, donde se redujo un 31 % frente al 13 % de 2005 (tabla 2). Dicha disminución fue causada por la reducción significativa del peso medio del fruto, de un 27 % en 2005 y de un 18 % en 2006. El número de frutos por árbol no mostró diferencias significativas entre ambos tratamientos. Tras dos años de seguimiento del ensayo, el efecto general conseguido fue una disminución significativa del 22 % en la producción acumulada del tratamiento RD, como consecuencia de la disminución del 22 % en el peso medio del fruto (tabla 2). En cambio, la eficiencia productiva en el uso del agua (EUA) media del tratamiento RD fue de  $11,7$  kg/m<sup>3</sup> frente a  $9,6$  kg/m<sup>3</sup> del control. Durante los dos años de ensayo la EUA aumentó significativamente en los árboles del RD, pese a la reducción de la cosecha, debido al ahorro de agua conseguido en los periodos de supresión del riego (36 %). Sin embargo, en variedades de recolección temprana dicho ahorro implica un retraso en la recolección, ya que se tarda más tiempo en alcanzar el calibre ( $> 58$  mm) [4] (Domingo et al., 1996).

Respecto a los parámetros de calidad del fruto, el estrés hídrico acumulado afectó algunos procesos de maduración, reduciendo significativamente el diámetro y la altura del fruto, espesor de corteza e incrementando el porcentaje de zumo. También aumentó el índice de color externo, lo que supone un menor tiempo de desverdizado en cámara. Los SST y la acidez fueron significativamente superiores al control (tabla 3), como también ha sido observado previamente por otros autores [5] (Ginestar y Castel, 1996).

### 4. Conclusiones

La estrategia de riego empleada, supuso una reducción de la producción y consecuentemente una disminución de los beneficios obtenidos. En periodos de escasez de agua, podría ser una alternativa, con el objeto de sacar la producción adelante con el menor impacto posible, o bien, para evitar un exceso de calibre en aquellos años en lo que hay una sobreproducción y se retrasa la recolección.

### 5. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por CICYT (AGL2006-11319-C04-04 y AGL2007-6537-C04-04) y por la beca predoctoral FPI concedida por el Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA) a J.M. Robles.

### 6. Referencias bibliográficas

[1] Domingo, R., Ruíz-Sánchez, M.C., Sánchez-Blanco, M.J., Torrecillas, A., 1996. Water relations, growth and yield of Fino lemon trees under regulated deficit irrigation. *Irrig. Sci.* 16, 115–123.

[2] Doorembos, J. y Kassam, A.H. 1986. *Estudios FAO Riego y Drenaje* 33. Ed. FAO, Roma. 212 pp.

[3] Ginestar, C., Castel, J.R., 1996. Responses of young clementine citrus trees to water stress during different phenological periods. *J. Hortic. Sci.* 74 (4), 551–559.

[4] Mitchell, P. D., Chalmers, D. J., Jerie, P. H. and Burge, G. (1986). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 111, 858-861.

[5] Schölander, P., Hammel, H., Bradstreet, E. and Hemmingsen, E. (1965). Sap pressure in vascular plants. *Science* 148, 339-345.

### Tablas y Figuras

**Tabla 1.** Incremento del área de sección transversal del tronco ( $I_{ASTT}$ ) del injerto y del patrón para los años 2005 y 2006, así como el incremento total. Cada valor corresponde a la media de 6 árboles por tratamiento.

$I_{ASTT}$ (cm <sup>2</sup> año <sup>-1</sup> )	Injerto			Patrón		
	2005	2006	Total	2005	2006	Total
Control	28,1	24,0	52,1	18,6	19,4	38,0
RD	13,9	11,4	25,3	10,7	11,2	21,9
<b>Análisis de varianza</b>						
Tratamiento	*	*	*	*	*	**

\*, \*\* indican diferencias significativas a  $P<0,05$ ;  $P<0,01$ , respectivamente.

**Tabla 2** Influencia del RD sobre los diferentes parámetros de producción de limonero Fino para las campañas de 2005 y 2006. Cada valor es el promedio de 6 árboles por tratamiento. Acumulado durante los 2 años de ensayo de kg/árbol, nº frutos/árbol y promedio del peso del fruto de ambos años.

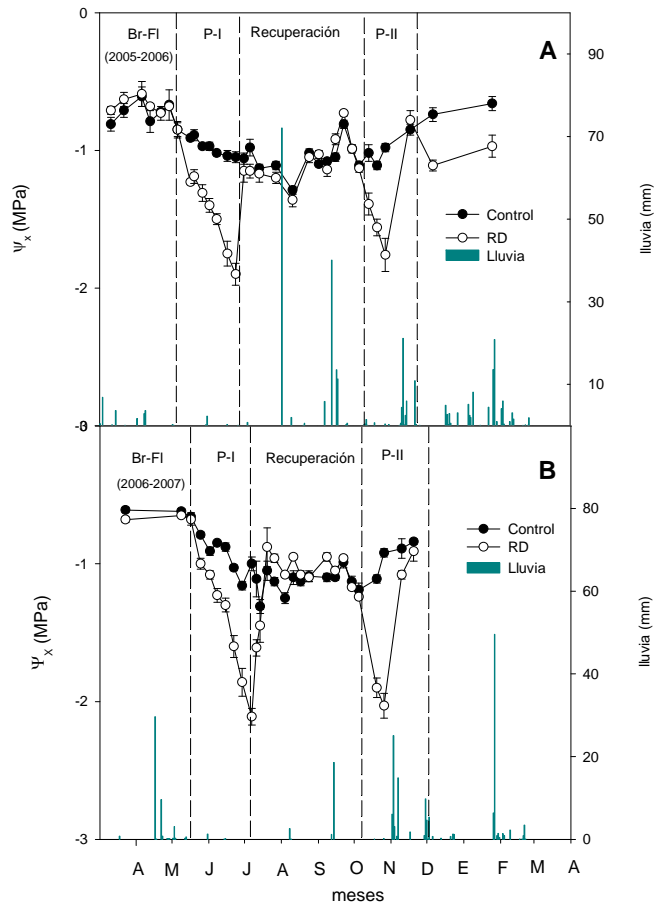
Año	Tratamiento	Producción (kg/árbol)	Nº frutos/árbol	Peso medio fruto (g/fruto)
2005	Control	116,2	858	138,4
	RD	100,7	998	101,1
	Significación	n.s.	n.s.	***
2006	Control	104,8	646	163,0
	RD	72,5	543	133,7
	Significación	**	n.s.	***
Acumulado	Control	221,0	1504	150,7
	RD	173,2	1541	117,4
	Significación	***	n.s.	***

\*\*, \*\*\* y "n.s." indican diferencias significativas a  $P<0,01$ ;  $P<0,001$  y no significativas, respectivamente.

**Tabla 3.** Influencia del RD sobre los diferentes parámetros externos e internos de calidad del fruto de limonero Fino para las campañas de 2005 y 2006.

Año	Tratamiento	Diámetro (mm)	Altura (mm)	Espesor corteza (mm)	Índice color externo	Zumo (%)	Corteza (%)	SST (º Brix)	Acidez (g/L)
2005	Control	62,6	81,3	5,6	-3,7	42,4	49,6	8,8	45,9
	RD	58,5	72,7	4,9	-2,1	48,7	43,1	9,3	49,3
	Significación	**	***	**	**	**	***	*	**
2006	Control	65,6	87,8	6,5	-3,2	35,1	51,4	9,0	38,9
	RD	61,6	79,9	5,3	-1,1	38,9	49,6	9,5	41,8
	Significación	*	*	***	**	**	n.s.	**	***

\*, \*\*, \*\*\* y "n.s." indican diferencias significativas a  $P<0,05$ ;  $P<0,01$ ;  $P<0,001$  y no significativas respectivamente.



**Figura 1.** Evolución estacional del potencial hídrico de xilema ( $\Psi_x$ ) medido a mediodía en las campañas de 2005 y 2006. Cada punto representa la media de 6 medidas por tratamiento. Las barras de error representan el error estándar de la media.

## Aplicación de estrategias de riego deficitario controlado en albaricoquero

F. Pérez-Sarmiento, R. Alcobendas, O. Mounzer, E. Nicolás, J.J. Alarcón

Departamento de Riego. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC). Apdo. 164. 30100 Espinardo (Murcia). España.  
frapesar@cebas.csic.es

### Resumen

Se estudiaron los efectos de estrategias de riego deficitario controlado (RDC) sobre albaricoqueros de 9 años de edad (*Prunus armeniaca* L. cv. "Búlida") injertados sobre patrón franco de 'Real Fino'. Para ello, se establecieron 2 tratamientos de riego, uno de riego control, que se regó satisfaciendo los requerimientos hídricos del cultivo (100% ETC) y un tratamiento de RDC, que consistió en reducir los aportes de agua con respecto a la ETC en los periodos no críticos en este cultivo: a) 40% de la ETC desde floración hasta el final de la primera fase de crecimiento del fruto; b) 60% de la ETC durante la segunda fase de crecimiento del fruto y c) 50% y 25% durante la post-cosecha final (60 días después de recolección), diferenciando 2 periodos de 30 días, el primero al 50% de la ETC, y otro hasta la caída de hojas al 25% de la ETC. Los resultados obtenidos indican que el albaricoquero es una especie adecuada para realizar estrategias de RDC, debido principalmente a la clara separación entre el crecimiento vegetativo y reproductivo y, también al efecto de crecimientos compensatorios que se producen en los frutos que han estado bajo RDC, lo cual hace que finalmente no se produzcan mermas significativas de calibre. Además, ciertas características cualitativas, como el nivel en sólidos solubles, sabor y coloración de la fruta, se ven incrementadas. Estas dos razones, junto con ahorros de agua vía riego, del 39%, conducen a que estrategias de RDC puedan suponer una clara alternativa en zonas con infradotación hídrica, como es el sureste español.

**Palabras clave:** conductancia estomática; estrés hídrico; fotosíntesis; *Prunus armeniaca* L.; riego deficitario controlado.

### 1. Introducción y objetivos

La agricultura de regadío utiliza alrededor del 75% del total del agua que se deriva en España para los diferentes usos. Debido al incremento de demandas más prioritarias sobre este recurso como la doméstica o industrial, y a un excesivo desarrollo de regadíos (en relación a los suministros sostenibles), se han intensificado las presiones sobre el sector agrícola para que se reduzca el volumen de agua utilizado en los regadíos. Además, el desequilibrio entre una demanda hídrica en aumento y una oferta de recursos hídricos estable o en declive expresa el grave problema actual de la agricultura de regadío.

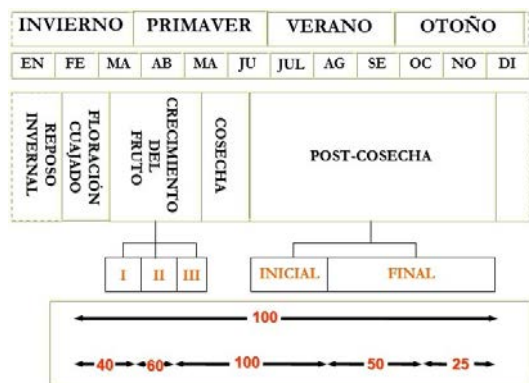
Así, en los últimos años están cobrando mucha importancia los estudios que aborden la aplicación de estrategias de riego deficitario controlado, cuyo fundamento es reducir los aportes de agua en los momentos fenológicos del cultivo que no suponen un efecto negativo en la producción e incluso pueden resultar en mejoras de algunos aspectos cualitativos de las cosechas obtenidas [2]

Por otro lado, la importancia socioeconómica del albaricoquero en la Región de Murcia, con 10.000 ha de cultivo, significando el 70% de la producción nacional [4] justifica la necesidad de llevar a cabo estudios encaminados a mejorar el conocimiento de la respuesta de este cultivo a condiciones ambientales adversas, entre las que se incluyen los periodos de sequía, los cuales son característicos de los agrosistemas mediterráneos. El objetivo fue llevar a cabo estos estudios en la variedad de albaricoquero "Búlida" de cara a confeccionar adecuados programas de riego deficitario controlado para esta especie.

### 2. Materiales y Métodos

El ensayo fue llevado a cabo en una finca comercial situada en Fuente Librilla, Mula (Murcia), en 2008, sobre albaricoqueros de 9 años de edad (*Prunus armeniaca* L. cv. 'Búlida') injertados sobre patrón franco de 'Real Fino', con un marco de plantación 8 x 6 m. Se aplicó riego por goteo, utilizándose un único lateral de riego por fila de árboles, con cinco goteros por planta, que arrojaban un caudal de 4 l h<sup>-1</sup>.

La parcela experimental ocupa una superficie aproximada de una hectárea, con 8 filas de 22 árboles cada una, la cual se dividió equitativamente en dos tratamientos de riego: un tratamiento de riego control (C), que se regó satisfaciendo los requerimientos hídricos del cultivo (100% ETc) y un tratamiento de riego deficitario controlado (RDC), que consistió en reducir los aportes de agua con respecto a la ETc, en distintos porcentajes en función del momento fenológico del cultivo. Así, los porcentajes de riego con respecto a la ETc del cultivo fueron: a) 40% desde floración hasta el final de la primera fase de crecimiento del fruto (febrero-marzo); b) 60% durante la segunda fase de crecimiento del fruto (abril); c) 100% desde la tercera fase de crecimiento del fruto hasta el final de la post-cosecha inicial (mayo-inicios de agosto); e) 50% y 25% durante la post-cosecha final, diferenciando 2 períodos, uno hasta mediados de octubre (50% ETc), y otro hasta la caída de hojas (final de noviembre) al 25% de la ETc (Figura 1). El agua de riego utilizada fue clasificada como de buena calidad agronómica.



**Figura 1.** Distribución de los porcentajes de agua respecto de la ETc fijados en el tratamiento control y en el de riego deficitario controlado a lo largo del año 2008.

Durante toda la estación se controló con frecuencia quincenal el contenido volumétrico del agua en el suelo ( $\theta_v$ ) mediante sonda de neutrones, el estado hídrico de la planta y los niveles de intercambio gaseoso. El estado hídrico de la planta fue evaluado a partir de medidas del potencial hídrico foliar ( $\Psi_{md}$ ) y potencial hídrico de tallo ( $\Psi_s$ ) utilizando la cámara de presión [6]. La conductancia estomática ( $g_s$ ) y la fotosíntesis neta ( $F_n$ ) fueron medidas a mediodía solar, utilizando un aparato de intercambio gaseoso portátil (LICOR Li-6400).

### 3. Resultados y Discusión

El estado hídrico de la planta y los niveles de intercambio gaseoso se vieron afectados significativamente por el tratamiento de RDC, si bien de los indicadores que fueron medidos, únicamente el  $\Psi_s$  reflejó significativamente la imposición del tratamiento de RDC en todos los momentos fenológicos en que fue impuesto (fase I y II del crecimiento del fruto y período post-cosecha final) (Tabla 1). El resto de indicadores ( $\Psi_{md}$ ,  $F_n$  y  $g_s$ ) sólo mostraron diferencias significativas, entre ambos tratamientos de riego, durante la segunda etapa de la post-cosecha final, cuando las reducciones de agua del tratamiento de RDC eran más importantes (25% de la ETc). (Tabla 1). Esto pone de manifiesto que el  $\Psi_s$  representa el mejor indicador en planta de medida discontinua para programar el riego en albaricoquero ya que refleja mejor la falta de agua en el suelo que el  $\Psi_{md}$  [8]. En este sentido, los valores de  $\Psi_{md}$ ,  $F_n$  y  $g_s$  son muy variables ya que dependen de las condiciones climáticas reinantes en el momento de la medida.

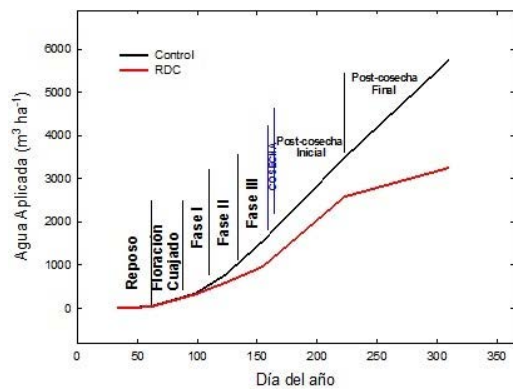
Según bibliografía el período más crítico al déficit hídrico del albaricoquero es la segunda fase de rápido crecimiento del fruto (fase III). Otro período sensible es el de post-cosecha inicial [5], período en el que se registran altos consumos de agua. La supresión del riego durante este período afectaría a la diferenciación floral, lo que provocaría un desarrollo tardío de las yemas florales, disminución del número y alteración de las mismas, además de largos tallos con hojas pequeñas. Bajo estas premisas se fijó el tratamiento de riego deficitario controlado (RDC), el cual supuso ahorros de agua con respecto al tratamiento de riego control (100% ETc) del 40% y 45% durante el período de crecimiento del fruto y período post-cosecha, respectivamente. Así, los aportes de agua vía riego ascendieron a 5740 y 3254  $m^3 ha^{-1}$  para el tratamiento control y RDC, respectivamente. Hay que resaltar que si fueran considerados los episodios de lluvia acontecidos en los distintos momentos del desarrollo del cultivo, la reducción de agua en el tratamiento de RDC ascendería aproximadamente al 30% con respecto del tratamiento control. En la figura 2 se recogen la dosis de agua aplicada vía riego, diferenciando las distintas fases fenológicas del cultivo.

**Tabla 1.** Niveles medios de potencial hídrico de tallo ( $\Psi_s$ , MPa), potencial hídrico foliar ( $\Psi_{md}$ , MPa), fotosíntesis neta ( $F_n$ ,  $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ ) y conductancia estomática ( $g_s$ ,  $mmol m^{-2} s^{-1}$ ),

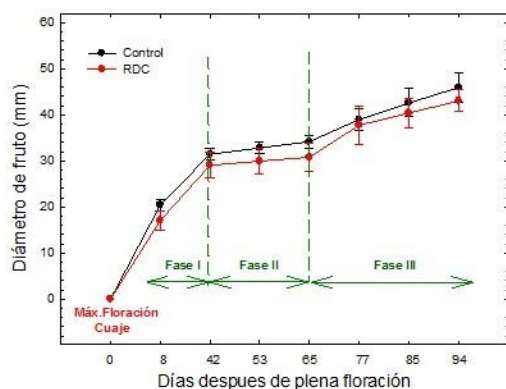
medidos a mediodía solar para cada período fenológico.

Período	$\Psi_s$		$\Psi_{md}$		$F_n$		$g_s$	
	C	RDC	C	RDC	C	RDC	C	RDC
Fase I	-0.61	-0.75	-1.26	-1.45	10.2	8.1	144.1	107.3
		*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Fase II	-0.64	-0.94	-1.28	-1.48	11.3	9.4	167.6	128.3
		***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Fase III	-0.66	-0.70	-1.36	-1.52	12.3	12.7	196.3	193.0
		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Post-cosecha Inicial	-0.91	-1.03	-1.65	-1.66	7.6	7.9	99.9	78.3
		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Post-cosecha Final I	-1.23	-1.55	-2.11	-2.12	6.2	5.8	91.9	72.1
		**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Post-cosecha Final II	-1.25	-1.81	-1.98	-2.34	6.0	1.1	76.6	22.2
		***	*	n.s.	***	n.s.	***	***

Los valores corresponden a la media de 18 medidas (n.s. = no significativo, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001).



**Figura 2.** Agua aplicada ( $m^3 ha^{-1}$ ) en el tratamiento control (línea negra) y en el tratamiento de riego deficitario controlado (línea roja) a lo largo del año 2008.



**Figura 3.** Evolución del diámetro del fruto (mm) en el tratamiento control (línea negra) y en el tratamiento de riego deficitario controlado (línea roja) a lo largo del año 2008. Las barras en cada punto representan el error estándar de la media.

Estos significativos ahorros de agua no tuvieron consecuencias ni en la producción obtenida ni en el tamaño final del fruto. Así, en cuanto a la

producción final obtenida, el tratamiento de riego control presentó una media de 156.7 kg/árbol, significativamente similar a la obtenida en los árboles del tratamiento RDC (153.3 kg/árbol). Por otro lado, el tamaño final del fruto no se vio afectado por el tratamiento de RDC, debido a que en la fase III de rápido crecimiento reproductivo, los frutos de este tratamiento experimentaron crecimientos compensatorios, por lo que alcanzaron un tamaño similar a los del tratamiento control. Así, todos los frutos de ambos tratamientos alcanzaron un diámetro superior a 40 mm, y por tanto, pudieron clasificarse de categoría extra o de primera categoría atendiendo al calibre (Figura 3). En numerosos cultivos arbóreos, existe una clara separación entre los períodos de activo crecimiento vegetativo y del fruto por la demanda de fotoasimilados. Este aspecto favorece la aplicación de estrategias de RDC, ya que permite controlar el crecimiento vegetativo sin reducir el tamaño del fruto [7]. Como ocurrió en nuestro ensayo, algunos frutos al recuperarse de un déficit hídrico temporal experimentan un crecimiento compensatorio, permitiendo alcanzar un tamaño similar al de los frutos que no han sufrido déficit.

Por otro lado, otros parámetros de calidad de fruto sí se vieron afectados por el tratamiento de RDC. En las tablas 2 y 3 se reflejan los principales parámetros físico-químicos de los frutos obtenidos en ambos tratamientos de riego. En general, los frutos del tratamiento de RDC presentaron un mayor índice de madurez como se vio reflejado en los valores significativamente más altos en los parámetros físicos referentes al color (piel y pulpa) y en los menores niveles de firmeza (Tabla 2). Al analizar los parámetros químicos también hay que destacar el mayor contenido en sólidos solubles ( $^{\circ}$ Brix) de los frutos obtenidos en el tratamiento de RDC. No se obtuvieron diferencias significativas en los parámetros químicos de pH, acidez total y % en materia seca (Tabla 3). Existen pocos trabajos que aborden el efecto que tienen distintas estrategias de riego sobre la calidad del fruto. En este sentido, algunos enólogos asocian el incremento de la calidad del vino en zonas semiáridas con el déficit hídrico [9]. Los beneficios del RDC en cuanto a la productividad y calidad del vino ha sido claramente demostrada [3]. Por otro lado, existen algunos trabajos en frutales de hueso que asocian el tratamiento de RDC con un incremento en el nivel de sólidos solubles [1].

**Tabla 2.** Parámetros físicos de firmeza del fruto (N) y color medido como luminosidad, HUE y CHROMA en piel y pulpa de frutos del tratamiento control y tratamiento de riego deficitario controlado en el momento de recolección.

Tratamiento	Firmeza	Luminosidad		HUE		CHROMA	
		Piel	Pulpa	Piel	Pulpa	Piel	Pulpa
CONTROL	52.9	67.1	62.6	78.8	78.6	48.1	44.7
RDC	36.5	69.2	63.9	85.3	82.9	50.6	46.6
Significación	**	n.s.	n.s.	**	**	**	*

(n.s. = no significativo, \*P<0.05, \*\*P<0.01).

**Tabla 3.** Parámetros químicos de pH, sólidos solubles ( $^{\circ}$ Brix), acidez total ( $\text{g } 100 \text{ ml}^{-1}$ ) y materia seca (%) en los frutos del tratamiento control y tratamiento de riego deficitario controlado medidos en el momento de recolección.

Tratamiento	pH	$^{\circ}$ BRIX	Acidez total	materia seca
CONTROL	3.71	9.47	1.19	11.54
RDC	3.75	10.28	1.14	11.60
Significación	n.s.	*	n.s.	n.s.

(n.s. = no significativo, \*P<0.05).

#### 4. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este primer año de experimentación vienen a indicar que el albaricoquero es una especie adecuada para realizar estrategias de riego deficitario controlado debido principalmente a la clara separación entre el crecimiento vegetativo y reproductivo y, también al efecto de crecimientos compensatorios que se producen en los frutos que han estado bajo RDC, lo cual hace que finalmente no se produzcan mermas significativas de calibre. Además, ciertas características cualitativas, como el nivel en sólidos solubles y la coloración de la fruta, se vean incrementadas. Estas dos razones junto con ahorros de agua vía riego, de al menos el 30%, vienen a significar que estrategias de RDC puedan suponer una clara alternativa en zonas con infradotación hídrica, como es el sureste español, al mantener la productividad e incluso mejorar la calidad de la fruta.

#### 5. Agradecimientos

Este estudio fue cofinanciado por tres proyectos: IRRIVAL (EU-FP6-FOOD-CT-2006-023120), CONSOLIDER INGENIO 2010 (MEC CSD2006-

0067) y SÉNECA (05665/PI/07) concedidos a los autores.

#### 6. Referencias bibliográficas

- [1] Buendía, B., Allende, A., Nicolás, E., Alarcón, J.J., Gil, M.I. 2008. Effect of Regulated Deficit Irrigation and Crop Load on the Antioxidant Compounds of Peaches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 3601-3608.
- [2] Fereres, E., Soriano, M.A. 2007. Deficit irrigation for reducing agricultural water use. *Journal of Experimental Botany* 58: 147-159.
- [3] Girona, J., Mata, M., del Campo, J., Arbones, A., Bartra, E., Marsal, J. 2006. The use of midday leaf water potential for scheduling deficit irrigation in vineyards. *Irrigation Science* 24: 115-127.
- [4] MARM. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 2009. ([www.marm.es](http://www.marm.es)).
- [5] Ruiz-Sánchez, M.C., Egea, J., Galego, R., Torrecillas, A. 1999. Floral biology of "Bulida" apricot trees subjected to postharvest drought stress. *Annals of Applied Biology* 135: 523-528.
- [6] Scholander, P.F., Hammel, H.T., Bradstreet, E.D., Hemingsen, E.A. 1965. Sap pressure in vascular plants. *Science* 148: 339-346.
- [7] Torrecillas, A., Alarcón, J.J., Domingo, R., Planes, J., Sánchez Blanco, M.J. 1996. Strategies for drought resistance in leaves of two almond cultivars. *Plant Science* 118: 135-143.
- [8] Vélez, J.E., Intrigliolo, D.S., Castel, J.R. 2007. Scheduling deficit irrigation of citrus trees with maximum daily trunk shrinkage. *Agricultural Water Management* 90: 197-204.
- [9] Williams, L.E., Matthews, M.A. 1990. Grapevines. En: Stewart, B.A., Nielsen, D.R., eds. *Irrigation of agricultural crops*. *Agronomy* 30. Madison, W.I.: ASA, CSSA, SSSA. p. 1019-1055.

## Could recently locally extinct population patches of *Astragalus nitidiflorus* regenerate from the soil seed bank?

F. Segura, J.J. Martínez-Sánchez, M. Aguado, J.A. Franco, María J. Vicente

Departamento de Producción Vegetal, Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT), Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena, España.  
frankyct@hotmail.com

### ABSTRACT

Persistence, distribution and dynamics of *Astragalus nitidiflorus* soil seed bank, a critically endangered species of southern Spain, were studied during four consecutive years to determine their importance to regenerate locally extinct patches of the only known *A. nitidiflorus* population worldwide. The spatial distribution of seeds on the ground was highly influenced by the presence or absence of adult plants and by the indehiscent character of the fruit. Results showed that most seeds were present in the surface layer, inside fruit and close to the mother plant. Seed longevity was low in general, but higher for seeds protected by fruit than for single ones after two years of burial. We discuss our results in relation with other patterns of seed dispersal or viability in arid environments, that are generally characterized by high spatial and temporal variability with a short-range dispersal. We concluded that this species is able to form a short-term persistent soil seed bank strongly influenced by environmental factors and population fluctuations. Based on these results, natural regeneration of patches locally extinct some years ago is unlikely from the soil seed bank and recovery should be attempted by sowing seeds or planting new specimens.

**Keywords:** Barochory; Endangered species; Seed burial; Seed dispersal; Seed longevity; Woody fruit.

### 1. Introduction

*Astragalus nitidiflorus* Jiménez Mun. et Pau (Leguminosae) is a perennial herb endemic to the province of Murcia (southern Spain), where it forms the only known metapopulation worldwide. This species is classified as Critically Endangered in accordance with IUCN criteria. The formation of a permanent soil seed bank is favorable in semi-arid ecosystems or in habitats where environmental conditions change dramatically and with unpredictable time patterns [1], ensuring the maintenance of a population in an area even in years with no yield. Seed dormancy and longevity are likely extremely important in the maintenance of soil seed banks, but their formation is probably also highly influenced by the seed input or seed production. Hard-seededness is a widely occurring feature in Leguminosae that imposes physical seed dormancy allowing the long-term burial of seeds and consequently the formation of persistent soil seed banks [2]. Taking into account that plant populations of most semi-arid regions are good candidates for the maintenance of seed banks, and the physical dormancy evidence found in seeds of *A. nitidiflorus*, we hypothesized that this species could form a persistent soil seed bank. In

other hand, although seed banks in arid ecosystems are characterized by high spatial and temporal variability [3], presumably in response to the dynamics of processes regulating seed additions and depletions and because most arid plants have short-range dispersal, no data are known about these topics in *A. nitidiflorus*. Therefore, the following questions were arisen. (i) Has *A. nitidiflorus* the ability to form a persistent soil seed bank? (ii) What is the quantitative importance of the seed bank over time? (iii) How are seeds distributed in the soil? The answer to these questions will allow us to take the necessary decisions aimed at preserving small patches that disappear over time and to recover them.

### 2. Materiales y Métodos

*Astragalus nitidiflorus* is a short-lived legume that colonizes old field in volcanic soils. The dispersion unit is the fruit, a woody indehiscent legume (ca. 2.5–3.0 cm), being barochory the main dispersal mechanism. The species constitutes a classical metapopulation with five small patchily distributed populations located near Cartagena (Murcia province), having a



Mediterranean-type climate with semi-arid conditions. The mean annual rainfall is 246 mm and annual potential evapotranspiration of 1319 mm.

Soil samples were collected from forty 1-m<sup>2</sup> permanent plots in June, from 2009 to 2012, in the largest known population (37°40'06.8"N, 1°08'00.6"E). Plots were 5-m apart from each other along four transects established perpendicularly to the maximum slope in the area of appearance of the species. In each plot two cores (20 cm × 20 cm) were sampled at two different depths: 0–5 and 5–10 cm. Simultaneously, the distance of the nearest adult plant of *A. nitidiflorus* to each plot was measured. Apparently healthy seeds content in soil samples were separated by physical separation method. To test seed viability, seeds extracted from soil samples were scarified with sandpaper and incubated in a growth chamber at 15°C and a 12-h photoperiod. To test if the presence of fruits and seeds in the soil was related to the proximity of adult plants, three plot categories were defined based on the presence/absence of adult plants: (i) presence of the adult near the plot (PA), (ii) absence of the adult near the plot since last year (ALY) and (iii) absence of the adult near the plot for at least two years (ATY). Considering barochory as the dispersal mechanism, a plant was present when it was in a radius ≤ 2 m of the plot.

To determine the viability over time of the seeds incorporated into the soil, two burial experiments were designed using fruits and seeds extracted from fruits (henceforth 'single seeds'). Two different depths were tested (2 and 7 cm). 64 lots of ten fruits were introduced into small aluminum trays with drainage, which were filled with soil from the habitat until reaching the desired depth. Another 64 lots of 25 apparently healthy single seeds were put into square nylon bags (5 cm × 5 cm) of 0.1-mm mesh filled with soil, and bags were buried into trays at the same conditions than fruits. The experiments were placed in a non-heated mesh irrigated with natural rainfall during two consecutive years. At the end of each season, four replicates of both burial fruits and single seeds were exhumed to count physically undamaged seeds. All apparently healthy seeds were tested for germination at 15 °C and 12-h photoperiod for 30 d, and those that germinated were considered the non-dormant viable seed fraction. To know the initial non-dormant viable seed fraction before burial four replicates of 25 apparently healthy seeds were tested for

germination at the same conditions. Then, ungerminated seeds were dried for 1 d and then slightly scarified with sandpaper, and incubated for an additional 30 d to determine the initial dormant viable seed fraction. Viability was evaluated by the final cumulative germination percentage. The same process was repeated at the end of the burial experiment to determine the viability of seeds after two years of burial. Also, before burial, 80 fruits were opened and their seeds analyzed to determine the initial percentage of apparently healthy seeds (some seeds are parasitized by *Bruchophagus astragalii*).

### 3. Results and Discussion

Most seeds and fruits were distributed in the surface layer and, except for 2011, most seeds were found inside fruits. This is explained by the type of fruit of *A. nitidiflorus*, an indehiscent and hard legume that prevents rapid release of seeds, which remain some years inside the fruit. Moreover, the considerable size of these fruits (ca. 1.9 cm × 0.8 cm) hampers their burial, and nearly 100% of them are on the soil surface.

The highest density of seeds was in PA plots and the lowest density in ATY plots (Fig. 1A). Most plots with seeds or fruits were PA and 83.6% of seeds and 89.2% of fruits were extracted in PA plots (Fig. 1B). So, the spatial distribution of fruits and seeds on the ground was very heterogeneous and highly influenced by the presence or absence of adult plants, showing the typical contagious distribution pattern observed in other semi-arid sites [4]. These data were expected because fruit dispersal is by gravity from prostrate stems. It has been demonstrated that restricted spatial dispersal could be selected under certain conditions to ensure plant survival in situ and establishment, to facilitate plant coexistence and to reinforce spatial aggregation in arid plants.

The soil seed bank density drastically decreased during 2009–2012 and percentage of plots with seeds also showed a continuous decline (Table 1). In the best year a mean of 221.54 viable seeds/m<sup>2</sup> was estimated, similar to that obtained for the shrub legume *Echinopartum algibicum*, another endemic threatened species, although in most years studied the amount of seeds found in soil was very low, and scarcer than other species that tend to form persistent seed banks such as shrubs of the genus *Cistus* (500–9000 seeds/m<sup>2</sup>) or some sprouting shrubs of the genus *Erica*

(8500 seeds/m<sup>2</sup>), abundant in disturbed forest or scrubland areas [5]. This decrease may be a direct consequence of the exceptionally rainy month of September 2009 (222.4 mm) that resulted in a massive emergence of seedlings from the soil seed bank (although most of them died before reaching the adult stage) as well as the dynamics of the population in the sampled site which showed a great reduction in the number of adult plants, declining from almost 2000 plants in 2008 to 73 and 82 individuals in 2010 and 2012 (personal observation). Taking into account that the soil seed bank was so sensitive to environmental factors and changes in population size, and density values in soil were not maintained relatively constant over time we should consider that this species has a short-term persistent seed bank [6].

The percentage of apparently healthy seeds was significantly affected by the time of burial ( $P < 0.001$ ), but not by depth. The initial percentage of apparently healthy seeds in fruits was only  $76.6 \pm 3\%$  (Fig. 2A) due to seeds parasitized by *B. astragalii*. The percentage of apparently healthy seeds extracted after each season showed a progressive decrease without significant differences between exhumed single seeds and those contained in fruits (Fig. 2A). In both cases, the major decrease was during the first season of burial remaining around 35–30% apparently healthy seeds after two years of burial (Fig. 2A). The percentage of non-dormant viable seeds was significantly affected by the factors of time of burial ( $P < 0.001$ ) and type of seeds ( $P < 0.001$ ), and their interaction ( $P < 0.001$ ). Depth of burial had no effect. Before burial, the percentage of non-dormant viable seeds was of  $29 \pm 5.3\%$  (Fig. 2B). After burial, the percentage of non-dormant viable single seeds decreased according to an inverse curve ( $F_{1,7} = 632.54$ ,  $P < 0.001$ ,  $R^2 = 98.9\%$ ) (Fig. 2B). However, in seeds extracted from buried fruits the decline was more gradual following a linear function ( $F_{1,7} = 26.3$ ,  $P = 0.001$ ,  $R^2 = 79\%$ ) (Fig. 2B).

Single seeds showed a significantly higher initial viability than for those contained in fruits ( $80.7 \pm 5.9\%$  versus  $61.8 \pm 2.5\%$ ,  $P = 0.005$ ), mainly because all single seeds used in this experiment were apparently healthy (parasitized seeds were discarded). However, after two years of burial the most significant decline in the viability was for single seeds, only  $5.2 \pm 0.6\%$  remained viable compared to  $29.3 \pm 3.1\%$  of seeds contained in fruits ( $P < 0.001$ ).

The woody indehiscent fruits appeared to slow the loss of seed viability, probably due to enhanced protection against fungal and non-fungal diseases, predators, preventing seed scarification by mechanical friction, and also protecting seeds from exposition to climatic factors, e.g. heat from isolation, which is one of the principal drivers of seed senescence. Initially, around 30% of seeds were non-dormant viable, but 100% germinated once they were scarified in the laboratory. This fact, and the seed coat formed by a palisade-cell epidermis (personal observation under scanning electron microscope) like other Leguminosae with hard coats, indicates that seeds of *A. nitidiflorus* have physical dormancy. However, if we consider the high loss of viability experienced in just two years of burial, the hardness of these seeds was not as strong as for other legumes or Cistaceae seeds that have long lifespan once buried in soil.

#### 4. Conclusions

All the evidence suggests that *Astragalus nitidiflorus* has the ability to form a short-term persistent soil seed bank, since it was verified that some seeds remained viable in soil for at least two years, although strongly influenced by environmental factors and population fluctuations. Based on this conclusion, natural regeneration from the soil seed bank is not expected for patches that have been absent for > 5 years if there has been no new input of seeds. Recovery of such locally extinct patches should be attempted by sowing seeds or planting new specimens. Knowledge of the morphological and dispersal fruit traits can be as necessary for explaining the demographic patterns of the species as classical soil seed bank studies.

#### 5. Acknowledgments

This work was financed by the 'Consejería de Agricultura y Agua de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia' and the 'Fundación Séneca de la Región de Murcia (1186/PI/09)'.

#### 6. References

- [1] Bonis, A., Lepart, J., Grillas, P., 1995. Seed bank dynamics and coexistence of annual macrophytes in a temporary and variable habitat. *Oikos* 74, 81–92.
- [2] Baskin, C.C. and Baskin, J.M., 1998. Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of

dormancy and germination, Academic Press, San Diego.

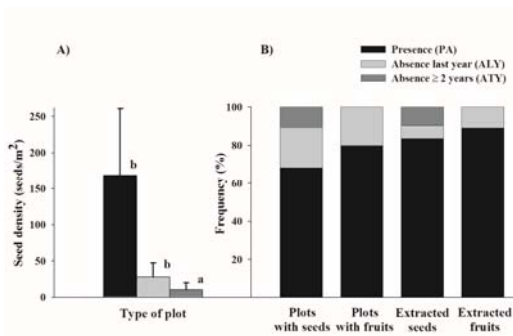
[3] Kemp, P.R., 1989. Seeds banks and vegetation processes in deserts, in: *Leck, M.A., Parker, V.T., Simpson, R.L. (Eds.), Ecology of Soil Seed Bank. Academic Press, San Diego, pp. 257–281.*

[4] Pugnaire, F.I., Lázaro, R., 2000. Seed bank and understorey species composition in a semi-arid environment, the effect of scrub age and rainfall. *Ann. Bot.* 86, 807–813.

[5] Ferrandis, P., Herranz, J.M., Martínez-Sánchez, J.J., 1999b. Fire impact on a maquis soil seed bank in Cabañeros national Park (central Spain). *Israel J. Plant Sci.* 47, 17–26.

[6] Thompson, K. and Grime, J.P., 1979. Seasonal variation in the seed banks of herbaceous species in ten contrasting habitats. *J. Ecol.* 67, 893–921.

Tables and Figures

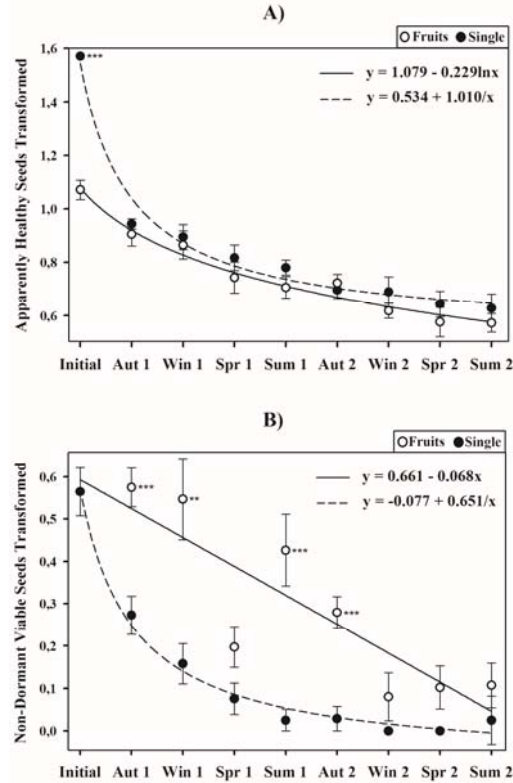


**Figure 1.** Seed density (A) and frequency of plots with seeds or fruits in relation to the presence of adult plants (B). Bars show standard errors. Different lowercase letters denote significant differences of seed density between types of plots.

Year	Percentage of plots with seeds	Percentage of plots with fruits	Mean seed density in plots ± S.E. (maximum density found in a plot)		
			Layer 0–5	Layer 5–10	Stat.
2009	37.5B	10A	208.81 ± 73.75Bb	12.73 ± 7.46Aa	$P_{15,10} = 0.004$
	n=15	n=4	n=14 (2240)	n=3 (203.5)	$\rho = 0.015$
2010	22.5AB	7.5A	15 ± 8.48Ab	1.25 ± 0.75Aa	$P_{10} = 0.024$
	n=9	n=3	n=7 (312.5)	n=2 (25)	$\rho = 0.436^{**}$
2011	15AB	10A	11.56 ± 8.29Aa	8.44 ± 8.12Aa	$P_{10} = 0.500$
	n=6	n=4	n=4 (325)	n=2 (325)	$\rho = 0.325^*$
2012	10A	7.5A	55 ± 43.7Aa	0 ± 0Aa	$P_{15,10} = 0.079$
	n=4	n=3	n=3 (1725)	n=0 (0)	$\rho = 0$
Stat.	$\chi^2 = 9.722^*$	$\chi^2 = 0.313$	$P_r = 0.003$	$P_b = 0.256$	

**Table 1.** Changes recorded in mean seed density and percentage of plots with seeds and fruits of *A. nitidiflorus* in the soil seed bank throughout the study period (2009–2012). (P: non-

parametric test). M–W: Mann–Whitney U. W: Wilcoxon signed–rank. F: Friedman. n: number of positive cases of total analyzed. rho: Spearman's rank correlation coefficient.  $\chi^2$ : chi–squared value. Significance was considered at 0.05(\*), 0.01(\*\*) and 0.001(\*\*\*) P–levels.



**Figure 2.** Lost of apparently healthy seeds (A) and non-dormant viable seeds (B) during the seed burial experiment. Mean values are root arcsine transformed. Bars represent the standard error. Significant differences between seeds contained in fruits or singles were considered at 0.05(\*), 0.01(\*\*) and 0.001(\*\*\*) P–levels. Equations of significant regression models are also shown.

## Efecto del estrés hídrico en un cultivo en invernadero de pimiento injertado

A.Gálvez López, J.López-Marín

Hortofruticultura, IMIDA (Instituto Murciano de I+D Agrario y Alimentario). C/ Mayor s/n La Alberca.30150 (Murcia), España.  
1297@coitarm.es

### RESUMEN

Los vegetales son cultivados frecuentemente en condiciones desfavorables que promueven el estrés, debido a la limitada disponibilidad de zonas de cultivo, las elevadas exigencias de los mismos fuera de temporada, y las intensas prácticas agrícolas que conducen a una limitadísima rotación de cultivos. El uso de injertos se ha convertido en una herramienta rápida alternativa a la metodología convencional, que permite incrementar la tolerancia de los vegetales a diversos estreses ambientales. En este trabajo se estudia la respuesta agronómica y fisiológica de la variedad de pimiento Herminio, injertada y sin injertar, siendo los portainjertos utilizados Creonte, Terrano y Atlante, y los tratamientos de riego empleados: Normal (NS): Testigo (100% ET, sin estrés) y S:(50 % ET, estrés hídrico), así como el efecto de los patrones sobre la calidad de la producción injertada. Creonte es una eficaz elección puesto que soporta bien las condiciones de estrés.

**Palabras clave:** *Capsicum annuum* L.; Herminio; portainjerto; técnica agronómica.

### 1. Introducción

Los estreses medioambientales representan las mayores condiciones limitantes para la producción hortícola y explotación de las plantas en todo el mundo. Entre esos importantes factores están agua, temperatura, nutrición, luz, oxígeno disponible, concentración de iones metálicos, y patógenos.

La baja disponibilidad de agua en el suelo, provoca el estrés abiótico de mayor incidencia en el crecimiento vegetal, que en los sistemas agrícolas representan grandes pérdidas económicas. Las pérdidas de cosecha debidas al estrés hídrico probablemente exceden a las provocadas por la combinación del resto de estreses [1]. Por todo ello, la sequía tiene un profundo impacto en la agricultura y en los sistemas ecológicos, de ahí que la capacidad de las plantas para soportar este estrés sea de gran importancia desde el punto de vista económico [2]. De este modo, en la actualidad y con el fin de mejorar la productividad agrícola, es necesaria la obtención de cultivos con altas producciones bajo condiciones de estrés hídrico.

El injerto es una técnica que permite inducir la resistencia o tolerancia de las plantas a determinados patógenos del suelo incrementando el crecimiento y rendimiento de las plantas injertadas con relación a las que no se injertan [3]. El uso de portainjertos posee otras propiedades de interés agronómico como el aumento de la producción de la variedad y la

mejora de la calidad de los frutos, la tolerancia a estreses abióticos, la precocidad [4], así como el aporte de vigor y rusticidad que permite paliar los efectos de la fatiga del suelo durante los dos primeros años [5], ya que al reiterar el cultivo se necesita de la desinfección del suelo [6]. En la producción hortícola, el injerto está siendo usado desde hace más de 50 años en muchas partes del mundo. Injertar no está asociado con los inputs agroquímicos para los cultivos y es por lo tanto considerado como una operación ecológica de sustancial y sostenible relevancia para sistemas de cultivo gestionados bajo producción integrada y orgánica [7]. Injertar es hoy en día considerado como una herramienta alternativa rápida contra la relativa lenta metodología del cultivo que pretende incrementar la tolerancia a estreses medioambientales de frutas y hortalizas [8].

El pimiento, junto con el tomate, es el cultivo que más superficie ocupa dentro de las especies que se realizan en cultivo protegido, habiendo de considerar además, que la casi totalidad de esta superficie cultivada es en invernadero. La alta demanda habida de pimiento fresco por parte de los mercados europeos originó un crecimiento espectacular del cultivo en el sureste español, principalmente en Almería, Murcia y Alicante.

El objetivo de este trabajo es ampliar el conocimiento del efecto del estrés hídrico en plantas de pimiento injertado bajo condiciones de invernadero puesto que se trata de una

técnica agronómica alternativa, rápida, eficaz y de bajo coste muy disponible para la agricultura.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Material vegetal y condiciones del invernadero

Las plantas se injertaron mediante el método japonés (Suzuki, 1972). La variedad de pimiento Herminio F1 (Syngenta Seeds, USA) de tipo rectangular y recolección en verde, se injertó sobre tres portainjertos comerciales: Atlante (Ramiro Arnedo, España), Creonte (De Ruiters Seeds, Holanda) y Terrano (Syngenta Seeds, USA). Plantas de "Herminio" sin injertar se usaron como control. Las plantas se trasplantaron el 5 de Enero de 2011 en un invernadero con 240 m<sup>2</sup> de superficie, localizado en la finca experimental "Torreblanca" del IMIDA en Murcia, SE España (lat. 37° 45' N, long. 0°59' W). El suelo se biosolarizó durante 90 días añadiendo una mezcla de 5 Kg/m<sup>2</sup> de estiércol de oveja y gallina (2:1, w/w). La densidad de plantación fue de 2'5 plantas/m<sup>2</sup>. El ensayo en campo se llevó a cabo siguiendo las prácticas culturales comunes usadas por los productores de pimiento de esta zona. El ciclo de cultivo finalizó el 13 Agosto de 2011.

Los tratamientos de riego utilizados fueron: NS: Testigo (100% ET, sin estrés) y S:(50 % ET, estrés hídrico). La radiación PAR y la temperatura del aire en cada unidad se monitorizaron durante el ciclo de crecimiento del cultivo usando un sensor Quantum (LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska, USA) y un Hobo U12 Temperature data logger (Onset, Massachusetts, USA), respectivamente.

### 2.2 Desarrollo vegetativo

15 plantas de cada combinación de injerto y "Herminio" sin injertar se usaron para medir los diferentes parámetros. Altura de la planta, diámetro del tallo, número de hojas y área foliar, peso fresco (PFF) y seco (PSF) foliar, peso fresco (PFT) y seco (PST) del tallo, peso fresco (PFR) y peso seco (PSR) de la raíz. El área foliar se midió usando un medidor de área foliar (LICOR-3100C; LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska, USA). El peso seco se determinó por secado en estufa a 60 °C hasta peso constante.

### 2.3 Intercambio de gases y fluorescencia

El intercambio de gases y fluorescencia se midió en hojas totalmente desarrolladas. La medida se realizó a los 205 DDT, desde las 9:00 am hasta las 11:00 am (GMT). La tasa fotosintética (A<sub>max</sub>, μmol CO<sub>2</sub>/m<sup>2</sup>s), conductancia estomática (g<sub>s</sub>,

mmol H<sub>2</sub>O/m<sup>2</sup>s), transpiración (E, mmol H<sub>2</sub>O/m<sup>2</sup>s) y CO<sub>2</sub> intercelular (C<sub>i</sub>, μmol CO<sub>2</sub>/mol aire) se midieron en condiciones constantes de saturación de luz (800 mmol /m<sup>2</sup>s) y 400 ppm de CO<sub>2</sub> con un medidor de fotosíntesis portátil LI-6400 (LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska, USA). La fluorescencia de la clorofila se determinó con un fluorímetro de pulsos modulado ADC FIM 1500 (Analytical Development Company Ltd., Hoddesdon, UK). Los valores de fluorescencia mínima en estado de oscuridad adaptada (F<sub>o</sub>) se obtuvieron por aplicación de una fuente de luz roja de baja intensidad (630 nm), mientras que los valores máximos de fluorescencia (F<sub>m</sub>) se midieron después de aplicar un pulso saturado de luz de 800 mmol /m<sup>2</sup>s. Así el máximo de eficiencia cuántica del PSII en el estado de oscuridad adaptada (30 minutos) se calculó, F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>= (F<sub>m</sub>-F<sub>o</sub>)/F<sub>m</sub>. La clorofila (SPAD) se determinó con un clorofilímetro SPAD-502 (Konica Minolta, Spectrum Technologies Inc., Illinois, USA).

### 2.4 Producción y calidad

Se recolectaron los frutos de las 15 plantas controladas. La calidad de la producción comercial se evaluó de acuerdo a las prácticas comerciales, descartándose los frutos con desordenes fisiológicos (soleados, blossom-end-rot, etc.) que no eran comerciales.

20 frutos aleatoriamente (4 por réplica del material vegetal) se seleccionaron a los 196 DDT para medir la calidad de la fruta. El contenido en sólidos solubles (°Brix) se determinó usando un refractómetro (Reichert Analytical Instrument, Depew, New York, USA). La acidez titulable se determinó con un valorador automático (Titroline easy, Schott, Mainz, Germany).

### 2.5 Diseño del experimento y análisis estadístico

Plantas injertadas y sin injertar crecieron en una unidad modular de invernadero. El diseño experimental fue en bloques al azar. Cada tratamiento (material vegetal) tenía tres bloques y 5 plantas cada uno. El programa estadístico utilizado fue Statgraphics calculando las diferencias significativas por ANOVA y los resultados fueron comparados con una probabilidad de P≤0'05 de acuerdo al test LSD.

## 3. Resultados y Discusión

Como promedio, el tratamiento de estrés disminuyó la altura de la planta en un 6%, el área foliar en un 33%, el número de hojas en un 27%, el peso fresco foliar en un 41%, el peso seco foliar en un 34%, el peso fresco del tallo en un 29%, el peso seco del tallo en un 22%, el peso fresco radicular en un 30% y el peso seco radicular en un

31% (Tabla 1). Las plantas injertadas sobre Atlante registraron mayor altura tanto en condiciones de estrés como de no estrés, que las otras combinaciones injertadas y Herminio sin injertar, siendo en general las plantas injertadas de un tamaño mayor a las no injertadas, a excepción de Terrano en condiciones de estrés y Creonte en condiciones de no estrés (Tabla 1). Esta mayor longitud, se presenta también en otros estudios llevados a cabo por [9,10], los cuales demostraron que las plantas injertadas eran más altas que las plantas control no injertadas. Y esta longitud, se puede deber al hecho que en la mayoría de ocasiones las plantas presentan mayor sistema radicular y esto da lugar a plantas más vigorosas.

Esta mayor vigorosidad también se puede observar en el Área foliar. La respuesta más sensible al estrés hídrico es el crecimiento celular; y es durante esta condición que las células permanecen más pequeñas y las hojas tienen menor desarrollo y, en consecuencia, se reduce el área foliar fotosintéticamente activa [11]. Las plantas en condiciones de riego normal (NS) presentan valores más altos que en el tratamiento de estrés (S), siendo Atlante la que alcanza un mayor valor y no encontrándose diferencias significativas dentro de este tratamiento (NS). Las plantas injertadas sobre Terrano en el tratamiento de S, son las que muestran una menor área foliar (33% menos que el mismo patrón en el tratamiento NS) encontrándose además en este tratamiento una mayor variabilidad, que puede ser debida a que determinados portainjertos pueden ser más o menos tolerantes a la sequía.

Con respecto al número de hojas, se alcanza el mayor valor en las plantas injertadas sobre Creonte en el tratamiento con estrés (S) pero no se encuentran diferencias significativas entre las combinaciones injertadas y el control. En el tratamiento sin estrés (NS) Atlante y Terrano son los que alcanzan mayores valores. Las plantas injertadas sobre Creonte son las que presentan mayor peso fresco foliar en el tratamiento NS. Con relación al peso seco foliar, Atlante en el tratamiento de NS es el que alcanza un mayor valor y presenta un 33% de peso fresco menos que en el tratamiento de NS. El peso fresco del tallo alcanza el mayor valor en Atlante dentro del tratamiento NS. No se encuentran diferencias significativas para el peso seco del tallo, y el peso fresco y seco radicular entre ambos tratamientos y las distintas combinaciones de injerto y el control.

En cuanto a los parámetros fotosintéticos las plantas injertadas sobre Creonte registraron los

valores más altos bajo ambas condiciones de cultivo para la fotosíntesis, conductancia estomática,  $[CO_2]$  intercelular y transpiración y los más bajos para el déficit de presión de vapor de la hoja (Tabla 2). La fotosíntesis es uno de los primeros procesos que se ve afectado por la escasez de agua. En referencia al uso eficiente del agua, las plantas injertadas sobre Terrano alcanzaron el mayor valor en S y sobre Atlante en NS, en cambio se obtuvieron los menores valores en las plantas control bajo ambas condiciones de cultivo. En condiciones de S todas los portainjertos y el control presentaron los menores valores en la eficiencia del PSII en hojas respecto al NS.

Bajo condiciones de estrés (S) la producción comercial disminuyó en Creonte un 14% con respecto a las condiciones óptimas (NS). Los frutos provenientes de plantas de pimiento de Herminio sin injertar bajo condiciones de estrés, son los que mayores desórdenes fisiológicos presentan (62%) en comparación con los mismos frutos bajo condiciones de NS. La producción no comercial y la cantidad de frutos soleados fue menor en Creonte y Terrano, bajo condiciones de NS. En cuanto al peso del fruto, los mayores valores se alcanzan en Creonte bajo el tratamiento NS, sin embargo en condiciones de estrés se redujo en un 31%. Los mejores valores en plantas injertadas sobre portainjerto Creonte, también son encontrados en trabajos llevados a cabo, en condiciones de sombreado y no sombreado [12]. En el tratamiento de NS todas las variedades excepto Creonte, presentan una longitud del fruto mayor que en S. Con respecto a la anchura existen diferencias significativas entre S y NS obteniéndose los mayores valores en éste último, aunque existen diferencias significativas, éstas no hay que tenerlas en cuenta, ya que no son valorables las mismas a nivel comercial. Como regla general, las plantas estresadas producen frutos con un mayor contenido en sólidos solubles, obteniéndose el valor mayor en Creonte. En cuanto a la acidez titulable, Creonte alcanza el mayor valor en condiciones de S.

### Tablas y Figuras

**Tabla 1.** Parámetros vegetativos de las plantas de pimiento con cada combinación de injerto y control, en condiciones de estrés (S) y no estrés (NS).

Parám.	T	H	H-A	H-C	H-T
Altura (cm)	S 167,38aA	182,38bA	171,50abA	163,50aA	173,63abA
Á. foliar (cm <sup>2</sup> )	S 16977,2abA	14062,80ab	17408,30bA	12821,90a	18146,30aA
Nºe	S 458,75aA	538,75aA	579,50aA	480,50aA	552,00aA
Hojas	S 379,03aA	378,90aA	416,08aA	368,80aA	482,00aA
PFF (g)	S 78,82aA	73,35aA	80,09aA	73,18aA	482,00aA
PSF	S				

(g)	N	83,68abA	110,72cB	82,34aA	102,81bcB
PFT	S	960,93aA	903,58aA	973,35aA	843,55aA
(g)	N	1042,15aA	1274,38bB	990,28aA	1076,85aA
PST	S	224,08aA	243,73aA	220,88aA	194,35aA
(g)	N	223,03aA	266,20aA	211,50aA	250,23aA
PFR	S	68,98aA	96,55bA	74,28abA	80,45abA
(g)	N	74,40aA	106,00aA	76,07aA	114,83aA
PSR	S	22,33aA	28,83aA	24,33aA	25,03aA
(g)	N	25,28aA	31,05aA	30,53aA	36,38aA

H: Herminio; H-A: Herminio-Atlante; H-C: Herminio-Creonte; H-T: Herminio-Terrano; Letras diferentes indican diferencias significativas, las minúsculas entre patrones y las mayúsculas entre tratamientos (Test LSD, P<0,05).

**Tabla 2.** Parámetros fotosintéticos de las plantas con cada combinación de injerto y control, en condiciones de estrés (S) y no estrés (NS).

Parám.	T	H	H-A	H-C	H-T
A ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	S	16,12aA	18,72abA	20,23bA	10,86aA
	N	20,68abB	21,12abB	22,40bB	15,80aB
g <sub>s</sub> ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	S	0,55aB	0,69abA	0,75bA	0,11aA
	N	0,47aA	0,63abA	0,95bB	0,49aB
Ci ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ )	S	261,60aB	281,02bB	282,45bA	178,64a
	N	250,40aA	264,10ab	283,80bA	257,13a
E ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	S	11,80aA	12,42aA	14,66bA	4,87aA
	N	13,30aB	13,50bB	13,60bA	10,88aB
VpdL (kPa)	S	2,80bA	2,73bA	2,43aA	4,42bA
	N	2,89bA	2,70aA	2,22aA	3,07aB
WUE	S	1,30aA	1,37aA	1,65bA	2,25cA
	N	1,44aB	1,60bB	1,58bA	1,57aB
Clorofila	S	61,10aA	61,05aA	63,55aA	62,10aA
	N	61,20aB	57,48aB	60,33aB	60,08aB
Fv/Fm	S	0,76aA	0,80aA	0,79aA	0,77bA
	N	0,80aB	0,81aA	0,80aA	0,81aA

H: Herminio; H-A: Herminio-Atlante; H-C: Herminio-Creonte; H-T: Herminio-Terrano. Letras diferentes indican diferencias significativas, las minúsculas entre patrones y las mayúsculas entre tratamientos (Test LSD, P<0,05).

**Tabla 3.** Producción Total, comercial, no comercial y frutos soleados de las plantas de pimiento con cada combinación de injerto y control, en condiciones de estrés (S) y no estrés (NS).

Parám.	T	H	H-A	H-C	H-T
Prod. total (Kg plant <sup>-1</sup> )	S	3,78aB	3,86bA	4,18bA	3,77aA
	NS	3,55aA	3,80bA	4,37cA	3,73bA
Prod.comercial (Kg plant <sup>-1</sup> )	S	2,62aA	2,97bA	3,25cA	2,94bA
	NS	2,80aB	3,10bB	3,79cB	3,20bB
Prod. no comercial (Kg plant <sup>-1</sup> )	S	1,16cB	0,90bB	0,93bB	0,83aB
	NS	0,75bA	0,71bA	0,58aA	0,53aA
Soleado (Kg plant <sup>-1</sup> )	S	0,73bB	0,56aB	0,60aB	0,50aB
	NS	0,45bA	0,46bA	0,38aA	0,33aA
Peso fruto (g)	S	105,16aA	109,36aA	123,7bA	106,94aA
	NS	145,45aB	143,25aB	179,60bB	144,49a
Longitud (mm)	S	74,24aA	87,24aA	102,42bA	92,40bc
	NS	96,92aB	96,64aB	96,67aB	102,18a
Anchura (mm)	S	71,46aA	71,49aA	74,81bA	69,81aA
	NS	74,13aB	79,96aB	89,49bB	72,75aB
Firmeza (Kg/cm <sup>2</sup> )	S	2,04aA	2,18bA	2,26bA	1,98aA
	NS	1,96aA	2,26bA	2,36bA	2,16aA
% MS	S	6,81bB	6,60aB	6,88bB	6,77aB
	NS	6,63bA	6,28aA	6,34aA	6,09aA
Acidez titulable (% Ácido cítrico)	S	0,091abA	0,097abB	0,110bA	0,079aA
	NS	0,089aA	0,093aA	0,092aA	0,079aA
°Brix	S	5,38aB	5,44aB	5,58bB	4,97aB
	NS	4,74aA	4,92bA	4,82abA	4,73aA

H: Herminio; H-A: Herminio-Atlante; H-C: Herminio-Creonte; H-T: Herminio-Terrano; Letras diferentes indican diferencias significativas, las minúsculas entre patrones y las mayúsculas entre tratamientos (Test LSD, P<0,05).

#### 4. Conclusiones

La elección del portainjertos Creonte es una eficaz alternativa puesto que soporta bien las condiciones de estrés.

#### 5. Agradecimientos

A los proyectos PO 07-4 y PO 07-41 de la Unión Europea-Feder 80% PO Región de Murcia.

#### 6. Referencias bibliográficas

[1] Reddy AR., Chaitanya KV., Vivekanandan M. 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J. of Plant Physiology*. 161: 1189–1202.

[2] Shao HB., Chu L., Jaleel CA., Zhao CX. 2008. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus Biologies*. 331: 215-225.

[3] López-Marín, J., Gálvez, A., González, A. 2011. Effect of shade on quality of greenhouse peppers. *Acta Horticulturae*. 893: 895-900.

[4] Fernández, E. J., Camacho, F., Díaz, M. 2006. El injerto en el control de enfermedades telúricas en hortalizas. En: Control de patógenos telúricos en cultivos hortícolas. Edcs. Agrotécnicas S.L. 65-75.

[5] Lacasa, A., Guerrero, M. M., Ros, C., Guirao, P., Torres, J., Bielza, P., De Paco, T., Contreras, J., Molina, R., y Torné, M. 2002. Desinfección del suelo en invernaderos de pimiento con dicloropropeno+cloropicrina (Telopic EC). *Agrícola Vergel*. 245: 256-266.

[6] Ros, C., Martínez, M.A, Guerrero, M.M., Torres, J., Lacasa, M.C., Lacasa, A., Bello, A. 2007. Comportamiento de la resistencia a Phytophthora y Meloidogyne de patrones de pimiento. *Actas de Horticultura*. 48: 534-537.

[7] Rivard, C.L. and F.J. Louws. 2008. Grafting to heirloom tomato production. *HortScience*. 43: 2104-2111

[8] Flores FB., Sánchez-Bel P., Estañ MT., Martínez-Rodríguez MM., Moyano E., Morales B., Campos JF., García-Abellán JO., Egea MI., Fernández-García N., Romojano F., Bolarín MC. 2010. The effectiveness of grafting to improve tomato fruit quality. *Scientia Horticulturae*. 125: 211-217.

[9] Lee, J.M., Kubota, C., Tsao, S.J., Bie, Z., Hoyos Echevarria, P., Morra, L., Oda, M., 2010. Current status of vegetable grafting: diffusion, grafting techniques, automation. *Sci. Hortic*. 127: 93–105.

[10] Colla, G., Suarez, C.M.C., Cardelli, M., Roupheal, Y., 2010. Improving nitrogen use efficiency in melon by grafting. *HortScience*. 45: 559–565.

[11] Parra Q R A, J L Rodríguez O, V A González H 1999. Transpiración, potencial hídrico y prolina en zarzamora bajo déficit hídrico. *TERRA Latinoam*. 17:125-130.

[12] López et al. Grafting is an efficient alternative to shading screens to alleviate thermal stress in greenhouse-grown sweet pepper. 2013. *Scientia Horticulturae*. 149: 39–46.

## La aportación de las Villas Rurales a la formación del paisaje de la región de Murcia

F. Medina<sup>(1)</sup>, J. Ochoa<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Ayuntamiento de Murcia. Servicio Medioambiente. francisco.medina@ayto-murcia.es

<sup>(2)</sup> Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT), Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena, España

### RESUMEN

La transformación de tierras consiguiendo nuevos terrenos para dedicarlos a la actividad agrícola ha llevado apareada la construcción de edificaciones. Estas se ubicaron en los puntos predominantes de la finca por ser cruce de caminos, por su centralidad, por la distribución de agua, por su posición de dominación visual, etc. En la mayoría de las veces estos enclaves ofrecieron muchos valores paisajísticos

El jardín apareció junto a las edificaciones casi como un elemento imprescindible, aunque en muchos casos de una manera muy discreta resultando espacios muy elementales. Atienden a un denominador común: la limitación del agua para regadío. La escasa disponibilidad es el factor determinante del alcance de la intervención. Los pequeños caudales que se podían extraer de la actividad agrícola solo pudieron sustentar pequeños jardines. Esto obligó a multiplicar el ingenio para permitir que una explotación agrícola con fines de rentabilidad económica se convirtiera en una componente del paisaje, complementando y ampliando de esta manera el programa de intervención en el territorio.

Debido a la importancia del recurso agua los elementos relacionados con ella se convirtieron en piezas fundamentales del valor paisajístico (surgencias, balsas, canaletas, etc) y adquirieron una enorme valoración positiva en un entorno semiárido.

El trazado del jardín mediante caminos que se cruzan ortogonalmente obligados por un sistema de riego “a manta” se repetirá en casi el total de los casos. Aún cuando se busquen soluciones mas “paisajistas” en entornos arbolados, mayoritariamente de pinadas, se recurrirá a los caminos sobreelevados con respecto a las zonas de plantaciones.

**Palabras clave:** jardín; torre; agua.

La ocupación de territorios rurales, fuera de los poblamientos, comienza a partir del siglo I gracias a la pacificación romana del *Campus Spartarius*, dando lugar a la aparición en la región las primeras villas, grandes haciendas concedidas o arrendadas por el Estado romano. Significaron un medio colonizador y sirvieron para reorganizar en función suya, amplios territorios poco controlados hasta entonces. Hasta el siglo V las villas estarán en continua expansión por todo el territorio.

La situación social se alteró a partir de comienzos del siglo V (año 415) cuando los vándalos saquearon Cartagena. La gran inseguridad creada no se atenuará hasta un siglo después, dando lugar un periodo llamado bizantino que perdurará durante otro siglo [1]. Estas condiciones obligaron a adoptar medidas de protección, mediante el incremento de las fortificaciones. Se abandonaron numerosas villas

desprotegidas y desapareciendo un buen número de jardines.

No parece tampoco que tras la destrucción total de la ciudad de Cartagena (620-624), la ocupación visigoda ofreciera condiciones idóneas para la implantación de jardines.

Habrà que esperar a la incorporación de las tierras del sureste a los territorios que daràn lugar a Al-Andalus para encontrar situaciones propicias para el desarrollo de los jardines. Estas llegaràn en el momento del apogeo de la taifa murciana durante los siglos XII y XIII.

Las poblaciones hispano-musulmanas se encontraban generalmente rodeadas por terrenos dedicados a cultivos [2]. Al-Andalus era, pues, un país de sucesivos oasis [3]. Así sucedió en las mas importantes ciudades de la región: Murcia, Lorca y Mula, pero también en muchas



otras de menor importancia: Alhama, Molina, Librilla.....

La apertura de vegas a lo largo del curso del río Segura dio lugar a que los propietarios de tierras enclavadas en una misma zona formaran agrupaciones de viviendas denominadas Alquerías. Si en estas no se dieron jardines, primando sobre otras la utilidad agrícola de la tierra, distinto fue el caso de las Almunias donde una edificación enclavada en una gran explotación agrícola que se ordenaba como un jardín. Situadas en el exterior del recinto murado colaboraban con ese “cinturón verde” destacando entre todas las explotaciones agrícolas, siendo significativamente más extensas que el resto y donde se aplicaban las técnicas más innovadoras y se ensayaban la introducción de nuevos cultivos. Complementariamente servían de lugares de recreo a su propietario.

Varias Almunias han sido documentadas en la región. Las más importantes corresponden a la actual ermita de las Huertas en Lorca, la de los Alcázares y las que se encuentran en el extremo noreste de la Vega Media del Segura, entre las poblaciones de Cabezo de Torres y Monteagudo.

De estas últimas, destaca la Almunia asociada al Palacio del Castillejo, enorme finca que Ibn Mardenix poseyó en Monteagudo. Los restos arqueológicos dispersos por el entorno demuestran que el palacio estaba enclavado en medio de una cuidada explotación agrícola. Además de conducciones del sistema de riego, ha sido identificada una gran alberca de 161x136 m que se ha interpretado con un doble fin utilitario y lúdico y un gran jardín cercado, de 298x144 m, en la ladera del cerro del Castillejo. Cercana se encuentra la Almunia de Larache que cuenta igualmente con una alberca de grandes dimensiones (60 x 58 m) a sus pies y ya en Cabezo de Torres una tercera de 90 x 78 m relacionado con el actual Molino de los Armeros [4].

El desarrollo de estas explotaciones necesitó de la existencia de un sistema de riego que captando las aguas del río Segura mediante la presa de La Contraparada derivaba los caudales por una ingeniosa red de acequias hasta poder aportarlas a los cultivos

En Lorca adquirió notable importancia la zona conocida como los Reales, una almunia fundada sobre los restos de una villa romana y donde ahora se asienta la Ermita de las Huertas.

Durante la Alta Edad Media, la región se convirtió en terreno fronterizo. La consecuencia inmediata

fue un significado despoblamiento de las ciudades que se convirtió en casi absoluto del campo. La pacificación, en la edad moderna, fomentará la recuperación de aquellos territorios que fueron cultivados en las villas romanas.

Se inició así el proceso definitivo de transformación de terrenos en zonas de cultivos. Se colmataron de huertas los valles fluviales y paralelamente en los campos se fueron extendiendo los secanos hasta que con la fiebre roturadora del XVIII el crecimiento se hizo de manera exponencial. También en estas explotaciones agrícolas en secanos se construye una edificación principal de la finca a la que se acompaña de jardines muy modestos que repiten idénticas soluciones que las ofrecidas anteriormente.

Las zonas de cultivo donde primero comenzaron a transformarse en regadíos estables fueron las vegas del río Segura, aquellas tierras que permitían ser regadas con aguas derivadas mediante acequias desde el río. En ellas se da un tipo de asentamiento rural conocido como Casa Torre, donde una sólida edificación comanda una intervención en el medio.

El origen de estas Casas Torres es muy diverso. Unas son de claro carácter defensivo como Torre Almodóvar. Otras parecen tenerlo en una alquería hispano-musulmana, como Torre Miralles.

Otras son restos de fincas existentes en el interior del recinto amurallado de la ciudad hispanomusulmana como el caso de Torre Junterón o Zambrana donde hoy existe el huerto-jardín López Ferrer.

Cuando el carácter defensivo dejó de ser la prioridad las Casas Torre se convirtieron en el centro de explotaciones agrícolas que significaron modificaciones en el paisaje de la huerta de Murcia.

En muchas de ellas quedó un espacio destinado a jardín. Este queda, en la mayoría de los casos, diferenciado del resto de la finca o parcela al tratar los accesos mediante portales de machones de mampostería o sillería.

La ubicación del jardín depende de la disposición elegida para la construcción en la finca. Cuando la edificación se realiza a borde de camino principal generalmente la fachada principal es perpendicular a este y en el espacio frontal y por lo tanto a fachada de camino principal se forma el jardín, aunque también (Casón del Marques de Corvera, crtra de Beniajam) el recinto queda

cercado mediante tapias y el jardín se dispone en una de las fachadas laterales aumentando su privacidad. En los casos que la vivienda se retranquea hacia el interior de la finca y por lo tanto se hace necesario un camino secundario desde el principal y entonces la construcción o bien se hace a eje de este camino con lo que la fachada principal queda enfrentada al camino, o bien la construcción se adosa a este camino secundario quedando la entrada en una fachada lateral. En el primer caso es en el espacio frente a fachada donde se dispone el jardín (Torre Caradoc), (Villa Carmen, Espinardo), en el segundo el jardín suele ubicarse en la fachada posterior (Torre Zoco, Casa del Pino) o lateral (Torre Serrano, Churra).

En Torre del Carmen (Cabezo de Torres) aprovechaba la existencia de un altozano para ubicación de la vivienda que disfrutaba de la vista de toda la finca ajardinada.

A partir del siglo XIX algunos propietarios cedieron las edificaciones a encargados y aparceros, momento en el que generalmente desaparecieron los jardines. Simultáneamente otras nuevas fueron construidas como Torre Caradoc, con extensas superficies de jardín.

Algunas, caso de Torre Zoco, llegaron a ser importantes complejos agro-industriales (molino-almazara-almacenes) en época ilustrada aportando una significativa renovación agrícola en la zona.

Entre otras Torres de la Huerta que contaron con elementos de valor paisajístico se encuentran Torre del Castellar, Torre Arcayna, Torre Masa, Torre de los Castaños y Torre Villescás.

Superada la crisis de los siglos XVI y XVII, durante el XVIII se producirá una importante expansión de la agricultura tras la consecución de nuevas tierras de cultivo gracias al gran número de roturaciones que se realizan. En estas nuevas grandes fincas, con una muy escasa dotación de agua para riego que sólo permite unas pequeñas superficies dedicadas a cultivos hortícolas, la mayoría de la superficie se planta de cultivos de secano y generalmente unas edificaciones dedicadas a almacenes agrícolas, establos, viviendas de labradores y dominando todo el complejo la casa de los propietarios. Junto a la casa, en la fachada principal o en una de las laterales, surgirá el jardín. También es posible encontrarlo a ambos lados del camino de acceso, desde el camino principal a la edificación.

La finca del Azarque situada en las faldas de Sierra Espuña, reunía unas extraordinarias

cualidades suficientes para destinarla a ser la gran actuación de un poderoso y culto propietario, el X Marqués de los Vélez, pero que motivos de carácter político no favorecieron que se realizaran. Por el contrario el Molino del Consejero fue un complejo agroindustrial fomentado por un ilustrado que planeaba completar su actuación con la construcción de un jardín a la inglesa.

Otros complejos agroindustriales destacados fueron Las Peralejas (Sucina), Hacienda de Roda (San Javier), Borrambla (Gea y Truyols), Casa Riquelme (Sucina), Torre-Guill (Sangonera la Verde), Casa Grande (Don Gonzalo)

Los primeros jardines en estas villas rurales comenzarán a realizarse alrededor de principios del XIX. Estarán limitados por la escasa dotación de agua asignada y generalmente son posteriores a las edificaciones.

Características no muy diferentes tendrían las explotaciones agrícolas constituidas durante el siglo XIX.

Los territorios donde se asientan son de menor valor agrícola y requieren de mayores esfuerzos inversores para su puesta en producción.

El Carrascalejo (Bullas) donde se construye la villa entre 1861 y 1866 dominando toda la propiedad ordenada con criterios paisajísticos y un jardín en aterrazado junto a la construcción.

Torre Caradoc construida en unos almarjales de zonas hundidas de la huerta mediodía de Murcia, donde toda la finca se trata como un jardín.

El Parque, junto al Balneario de Archena es otro ejemplo como el anterior pero en finca de mayor extensión.

Villa Antonia en Lobosillo, Casa del Barón de Benifayó en Pinatar, Casa Valderas en Roldán y Lo Gea en Gea y Truyols completan los ejemplos más significativos del momento.

En los alrededores de la ciudad de Murcia y en zonas con las mejores dotaciones de agua desde acequias a partir de comienzos del XIX se dedican discretas superficies de cultivo a plantaciones de "flor cortada". Se levantan edificaciones para vivienda y se les dota de elementos (portadas, cercados, etc) que añadiéndoles valores las distinguía del resto de parcelas agrícolas.

Estos huertos, nombre con el que se designarán, llegarán a formar un rosario que circunde la ciudad. Por el oeste (Malecón): de los Cipreses, del Cura, del Jardinero (o de Hernández), de la Estrella, de los Claveles. Por el oeste (San

Andrés): de Pina, de San Andrés. Por el noroeste: Cadenas, Manú. Por el norte (Carretera Espinardo): de las Bombas. Por el noreste (Cigarral): de San José (Actual Oblatas), de Marín, del Conde. Por el levante (Puerta de Orihuela): Barba, de las Palmeras (Huerto del Cementerio).

A partir de finales del siglo XIX y motivado por el desarrollo económico a causa de la minería, enriquecidos burgueses afincados en Cartagena comprarán fincas en zonas rurales donde existían modestas superficies agrícolas con discretas dotaciones de agua procedentes de ceñas de sangre. Modernizarán la explotación agrícola aumentando primero los recursos de agua para riego mediante ingenios eólicos, realizarán nuevas plantaciones y construirán sus viviendas de recreo, algunas de ellas sobre las antiguas casas solariegas existentes y las dotarán de jardines.

De ésta época es Torre Calín, en La Aljorra, Villa María, también denominada La Piqueta, en San Félix, y las fincas La Flora y La Rosa en La Palma.

Otras significadas Casas Torre encontramos en El Algar (La Capellanía), El Plan (Torre Llagostera también denominada Huerto de las Bolas y El Retiro), La Aljorra (Torre Asunción o de Los Avilese), La Palma (Hacienda Moncada), Pozo Estrecho (Los Pinos, Villa Carmen o Torre Valeriola y Torre Nueva), San Félix (Villa Calamari, conocida como el Palacete Versalles, y La Piqueta o Villa María), Santa Ana (Villa Pilar), y en La Unión (Villa Dolores) forman parte de este legado.

De este modo, en la mayoría de las fincas se desarrollaron jardines, generalmente ordenados mediante caminos cruzados ortogonalmente. Todos contaron con zonas donde la vegetación mediterránea aportaba sombras para facilitar la estancia. Los cultivos agrícolas se disponían para formar parte del programa paisajístico de la finca.

En la medida de lo posible el agua era incorporada al programa del jardín, mediante estanques y fuentes o al menos las canaletas de riego cumplían esas funciones.

El cenador se convierte en un elemento siempre presente en estos jardines. En la medida de lo posible se busca una posición elevada para conseguir también una función de mirador sobre el propio jardín, la finca o el entorno.

Es frecuente el empleo de la técnica del trencadís para la terminación de bancos, jarrones, etc. Las fuentes se acaban con piedras rústicamente trabadas.

En Murcia esta tendencia será menos acusada destacando la Casa del Pino y Torre Cierva, ambas en Santo Ángel y propiedad de miembros de la poderosa familia De la Cierva.

Los años 20 se presentaron en la región con aires favorables a las intervenciones paisajísticas, destaca Fuente Higuera (Bullas) y El Menjú (Abarán) y Casa Pelotas (Mula), aunque se siguen realizando intervenciones de corte clásico como en Casa Lo Montanaro (Avilese), Finca Lo de Casas (Churra)

Como una modesta herencia de las grandes fincas aparecerán durante finales del XIX y con mayor intensidad durante el primer cuarto del siglo XX una serie de agrupamientos de viviendas en parcelas. Estas son de un escaso tamaño que ya no son capaces de soportar una explotación agrícola, aunque si alberguen plantaciones cuya renta colabore en el mantenimiento de la vivienda. Se caracterizarán también por ser de ocupación estacional y en ello influirá el poder disfrutar del veraneo en lugares de mayor contacto con la naturaleza para algunos sectores de la burguesía de la región. Será un fenómeno que precederá a la ocupación de la costa para el mismo menester y dio lugar a la aparición de unos determinados lugares en las afueras de las más importantes ciudades.

Resaltan sobre todos, los Huertos de Totana y Alhama, las Alamedas de Lorca y El Verdolay-La Alberca en Murcia

#### Referencias bibliográficas

- [1] RODRIGUEZ LLOPIS, M.: *Historia de la Región de Murcia*. 1998
- [2] RAMÓN-LACA, L.: *Simbiosis arquitectura-paisaje. Evolución de los contornos de 4 ciudades*. Tesis Doctoral. UPM. Escuela Arquitectura. Madrid 1998.
- [3] TORRES BALBÁS, L.: *Ciudades Hispano-Musulmanas*. 2ª edic. Madrid 1985
- [4] NAVARRO, J. y JIMÉNEZ, P.: *El Castillejo de Monteagudo*. En *Casas y Palacios de Al-Andalus. Siglos XII-XIII*.

# SESIÓN IV



## Ingeniería Agroforestal y Economía

### RESÚMENES

## **Análisis de la variabilidad espacial y temporal de la precipitación en la provincia de Tungurahua, Ecuador, para una mejor planificación agrícola**

**J.E. Hunink<sup>(1,3)</sup>, W.W. Immerzeel<sup>(2)</sup>, A. Baille<sup>(1)</sup>, P. Droogers<sup>(3)</sup>**

<sup>(1)</sup> Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203, España,

j.hunink@futurewater.es

<sup>(2)</sup> Universiteit van Utrecht, P.O. Box 80115, 3508 TC, Utrecht, Países Bajos

<sup>(3)</sup> FutureWater, Costerweg 1V, 6702 AA, Wageningen, Países Bajos

### **RESUMEN**

En este estudio se presentan datos de la distribución espacial de las precipitaciones y las tendencias en la provincia de Tungurahua, Ecuador, a partir de un refinamiento de métodos científicamente probados. Se combinaron datos de las estaciones meteorológicas con datos de teledetección para conocer mejor la distribución espacial de la precipitación en las zonas donde se carece de observaciones directas y donde se quiere promover y modernizar la agricultura. La cantidad total de la precipitación en la cuenca varía desde alrededor de 500 mm/año en torno a Ambato hasta 4000 mm en el sureste de la provincia y se concluye que tanto la variabilidad temporal como la espacial son muy significativas. La media anual para toda la provincia oscila entre 1400 y 1700 mm. La zona más seca es también la zona con mayor variabilidad en el tiempo, coincidiendo con la zona principal agrícola. El régimen pluvial permite aquí cultivos de ciclo corto, lo que refleja la situación actual. Los cultivos plurianuales se producen en las zonas con una mayor precipitación y con menor variabilidad temporal. La comparación entre las observaciones y los valores obtenidos mediante el método indican una buena correlación. Se ha llevado a cabo una validación cruzada de las salidas del algoritmo para determinar en qué zonas la predicción es mejor o peor. En general se concluye que el método utilizado es muy útil, los resultados son satisfactorios y aplicables en otros lugares.

**Palabras clave:** Precipitación, TRMM, índice de vegetación, riego

### **1. Introducción**

Los patrones de lluvia pueden ser muy variables en el espacio y en el tiempo, especialmente en las zonas de alta montaña como en los Andes ecuatorianos. Para la toma de decisiones y la planificación hidrológica, la información fiable y precisa es necesaria ya que la precipitación es el motor principal del ciclo hidrológico y los sistemas de producción humanos.

Sin embargo, la estimación precisa de la distribución espacial de la precipitación en zonas extensas y diversas es compleja [1]. Algunos de los problemas de calidad, disponibilidad y cobertura que presentan los pluviómetros no existen en varios productos satelitales de precipitación que se encuentran disponibles actualmente.

En las últimas dos décadas, se lanzaron varios satélites y productos de precipitación utilizando la alta resolución temporal sobre la base de los

canales infrarrojos o las estimaciones de alta calidad de microondas o una combinación de ambas. En 1997 se puso en marcha la Misión de Medición de Lluvias Tropicales (TRMM) [2] con el objetivo de proporcionar estimaciones precisas globales de precipitación tropical mediante el uso de una combinación de instrumentos diseñados exclusivamente para la observación de lluvia.

La creciente cantidad de datos de otras variables biofísicas relacionadas con la precipitación, como los índices de vegetación y la altitud, ofrecen la oportunidad de llegar a estimaciones más detalladas y precisas de precipitación. La combinación de estas fuentes de información con las observaciones terrestres permite una estimación más precisa de los patrones de precipitación y su variabilidad espacial temporal.

La provincia de Tungurahua, Ecuador, se encuentra en una zona de los Andes con altos

gradientes climáticos y pluviométricos. En general, la provincia se enfrenta a un problema de escasez de agua que afecta el desarrollo y las economías de sus habitantes. La disponibilidad del recurso hídrico es altamente variable en tiempo y espacio, lo cual se debe principalmente a la variabilidad de las precipitaciones.

El objetivo de este proyecto es rellenar las lagunas de datos en las series pluviométricas registradas por las estaciones meteorológicas aprovechando las ventajas que ofrecen los actuales productos satelitales de precipitación, y hacer un análisis detallado de la variabilidad espacial y temporal de la precipitación utilizando diferentes datos de teledetección. El resultado principal de este análisis es la obtención de la distribución de precipitación para cada semana del periodo del estudio.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Enfoque

Uno de los productos claves de TRMM proporciona precipitación diaria con una resolución relativamente baja de 0,25 x 0,25 grados (aproximadamente 25 x 25 km, Figura 1b). Estos datos se pueden combinar con conjuntos de datos de índice de vegetación, climatología y altitud, que sirven para inferir y recrear (“proxy”) registros de la precipitación. De esta forma se ha mejorado un algoritmo basado en métodos científicos para aplicarlo a la provincia de Tungurahua con el fin de: (i) corregir y rellenar lagunas de datos en las observaciones de precipitación con datos TRMM y (ii) obtener mapas de precipitaciones semanales de la región, con una resolución espacial de 1x1 km. Estos algoritmos están basados en publicaciones de diversos artículos científicos e informes [3]–[5].

La base de estos algoritmos es: (i) la combinación de datos TRMM de resolución espacial baja, pero de alta resolución temporal (todos los días, km 25x25) con datos TRMM de resolución espacial alta, pero temporal baja (mensual, 4x4 km), (ii) la corrección de TRMM con las observaciones (iii) el uso del NDVI (índice de vegetación) para mejorar la resolución espacial hasta 1x1 km, (iv) el uso del modelo digital de terreno para la corrección de efectos de altura.

El mapeo de precipitación se basa en los siguientes conjuntos de datos:

- (i) datos de las estaciones disponibles (31 estaciones en total) dentro y en los alrededores de la zona de estudio de la precipitación diaria observada.
- (ii) Estimaciones espaciales diarias de precipitación de TRMM (producto 3B42\_v07), con una resolución espacial kilómetros 25x25m.
- (iii) Precipitaciones mensuales obtenidas de TRMM (producto 2B31\_v07), con una resolución de 4x4 kilometros espacial (más adelante: CLIM)
- (iv) Modelo Digital de Elevación (DEM) obtenido de SRTM, remuestreado de 90m a una malla de 1x1 km.
- (v) Índice de vegetación NDVI derivado del SPOT, producto VGT-S10 (síntesis de diez días) que es un producto trimensual compuesto

Para obtener el producto final, se han llevado a cabo varios procedimientos y pasos de análisis

### 2.2 Procedimientos

Los registros de precipitación observados (OBS) requieren un control de calidad, para detectar valores atípicos y evaluar las brechas de datos. Este control de calidad se ha realizado estudiando las series temporales una por una para identificar posibles anomalías. Las lagunas en los datos se rellenaron mediante el establecimiento de una relación lineal entre los valores de TRMM (3b42) y las observaciones diarias en cada ubicación de las estaciones meteorológicas.

Para los conjuntos de datos espaciales (TRMM 2b31, DEM y NDVI), los valores fueron extraídos en las ubicaciones de las estaciones meteorológicas. La serie temporal del NDVI se interpoló temporalmente, para obtener unas series semanales para todo el período (1998-2011). También los valores extraídos de la base de datos TRMM 2b31 se desagregaron a una serie semanal.

Basándose en todas las observaciones y datos en los puntos de las estaciones meteorológicas, se establecen los modelos de regresión a nivel semanal. Las variables independientes de la regresión en este caso son los conjuntos de datos DEM, CLIM y NDVI, para cada estación y cada semana de los 14 años [6]. Ya establecidos los modelos de regresión para cada semana, se aplicaron estos modelos a los conjuntos de datos espaciales. Para ello se cargaron las capas de las 3 variables de entrada (NDVI, CLIM o TRMM 2b31, y DEM) en un software SIG y se

calculó una capa para cada semana de los 14 años que representa la precipitación predicha.

Posteriormente se derivan los residuales (precipitación predicha por el modelo de regresión menos el valor observado) para cada estación. Estos residuos se interpolan espacialmente (método spline), que tiene como resultado una capa para cada semana del periodo que se añade a las capas predichas por los modelos de regresión. La suma de ambas es por lo tanto la salida final, resultando en una estimación de la distribución de la precipitación para cada semana del periodo de 14 años.

La validación cruzada se ha utilizado para obtener una estimación de la capacidad de predicción y de exactitud en cada punto. La metodología completa se explica con más detalle en [6]).

### 3. Resultados y Discusión

Los mapas de precipitación obtenidos con los modelos de regresión fueron corregidos con las interpolaciones espaciales de los residuales entre los valores observados y los estimados en las ubicaciones de las estaciones. Esto resultó en una serie temporal semanal de precipitación que cubre toda la región con una resolución de 1x1 km. La Figura 1 muestra las precipitaciones medias anuales calculadas en función de la serie semanal a lo largo de todo el periodo de 14 años.

Se puede observar que los patrones de las precipitaciones son muy variables. Se pueden caracterizar 3 zonas principales: la zona de páramo de la Cordillera Oriental Ecuatoriana (o Cordillera Real), que tiene una pluviometría anual superior a 1.000 mm con época lluviosa de abril a agosto (véase anejo I). Después los flancos orientales de la Cordillera Occidental con precipitaciones que llegan hasta por encima de 3000 mm por año en las partes más bajas de la provincia. La tercera zona es la Zona del Callejón Interandino, con precipitaciones anuales alrededor de los 500 mm, pero con importantes variabilidades debido a los microclimas en esta zona, o sea pequeñas zonas con características climáticas propias.

La variabilidad temporal de la precipitación se puede expresar mediante el cálculo del coeficiente de variación (el cociente de la desviación estándar de la precipitación media). Esto da una indicación de las diferencias relativas entre periodos húmedos y secos. La Figura 2 muestra la representación espacial del

coeficiente de variación, calculado en función de la totalidad de 14-años período de precipitación semanales.

El mapa muestra que en la región alrededor de la ciudad de Ambato, la variación temporal es la más alta. Esta variabilidad relativamente alta de las lluvias corresponde con las zonas donde se cultivan principalmente cultivos de ciclo corto. La zona un poco más al sur de Ambato muestra menor variabilidad (colores más azulados) y corresponde a las zonas donde se cultivan principalmente árboles frutales. También en las zonas del este, aguas abajo, el coeficiente de variación es bajo, y las cantidades de precipitación elevadas permiten la producción de fruta.

La capacidad de predicción del modelo se ha estudiado a fondo mediante el uso de validación cruzada, como se explica en la sección metodológica. El  $R^2$  obtenido quitando de forma secuencial una estación del ajuste de los modelos, se ha trazado e interpolado y se ve reflejado en el mapa de la Figura 3. Esto da una indicación de la precisión relativa de la salida final en toda la zona y la capacidad de predicción del procedimiento. El  $R^2$  promedio de todas las estaciones es de 0,75, en base a las precipitaciones mensuales. Esto indica que el método es capaz de predecir suficientemente bien las precipitaciones en base al método y los variables elegidos.

Es evidente que las zonas cerca de Ambato, que reciben la menor cantidad de lluvia (véase la sección siguiente) muestran una menor capacidad predictiva, debido a la mayor variabilidad temporal en estas áreas. Por otro lado, la precisión de la predicción es mayor en las zonas donde existe una alta densidad de estaciones. En el suroeste de la provincia (zona del arenal entre el Chimborazo y Piedramagra) la precisión es menor, debido a las características peculiares de esa zona y la baja densidad de estaciones. Por otro lado las precipitaciones en las zonas más húmedas de la provincia se predicen con mayor precisión.

### 4. Conclusiones

En este estudio se presentan datos de la distribución espacial de las precipitaciones y las tendencias en la provincia montañosa de Tungurahua, a partir de un refinamiento de métodos científicamente probados. El enfoque asume que el estado de la vegetación, la elevación y estimaciones satelitales de

precipitación son indicadores útiles para inferir la precipitación real. Los resultados confirman que este es el caso y que una parte significativa de la variación en la precipitación semanal se puede explicar por estos factores, con la vegetación como indicador principal. El método funciona mejor en las zonas relativamente secas, donde el desarrollo de la vegetación responde más directamente a las precipitaciones.

En el caso en que las precipitaciones son muy abundantes, por ejemplo más de 1000 mm, la relación entre el índice de vegetación y la precipitación se satura, y los otros factores son más relevantes en los modelos de regresión. La validación cruzada de las salidas de los modelos de regresión da un resultado satisfactorio.

La cantidad total de precipitaciones en la cuenca varía desde alrededor de 500 mm / año en torno a Ambato hasta 4000 mm en el sureste de la provincia y se concluye que tanto la variabilidad temporal como la espacial son muy significativas. La zona más seca es también la zona con mayor variabilidad en el tiempo, coincidiendo con la zona principal agrícola. El régimen pluvial permite aquí cultivos de ciclo corto, lo que refleja la situación actual. Los cultivos plurianuales se pueden producir en las zonas con una mayor precipitación media anual y con menor variabilidad temporal.

## 6. Referencias bibliográficas

- [1] W. Buytaert, R. Celleri, P. Willems, B. De Bièvre, and G. Wyseure, "Spatial and temporal rainfall variability in mountainous areas: A case study from the south Ecuadorian Andes," *J. Hydrol.*, vol. 329, no. 3–4, pp. 413–421, Oct. 2006.
- [2] J. Simpson, C. Kummerow, W. K. Tao, and R. F. Adler, "On the Tropical Rainfall Measuring Mission (TRMM)," *Meteorol. Atmos. Phys.*, vol. 60, no. 1–3, pp. 19–36, 1996.
- [3] W. W. Immerzeel, M. Rutten, and P. Droogers, "Spatial downscaling of TRMM precipitation using vegetative response on the Iberian Peninsula," *Remote Sens. Environ.*, vol. 113, no. 2, pp. 362–370, 2009.
- [4] R. Quiroz, C. Yarlequé, A. Posadas, V. Mares, and W. W. Immerzeel, "Improving daily rainfall estimation from NDVI using a wavelet transform," *Environ. Model. Softw.*, vol. 26, pp. 201–209, 2010.
- [5] W. W. Immerzeel, F. Pellicciotti, and A. B. Shrestha, "Glaciers as a Proxy to Quantify the Spatial Distribution of Precipitation in the

Hunza Basin," *Mt. Res. Dev.*, vol. 32, no. 1, pp. 30–38, Feb. 2012.

- [6] J. E. Hunink, W. W. Immerzeel, and P. Droogers, "A High-resolution Precipitation 2-step mapping Procedure (HiP2P): Development and application to a tropical mountainous area," *Remote Sens. Environ.*, vol. 140, pp. 179–188, Jan. 2014.

## Figuras

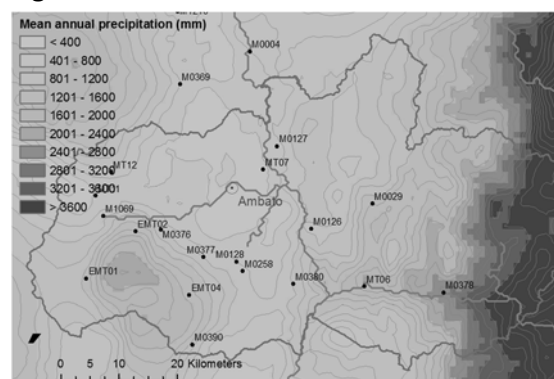


Figura 1. Las precipitaciones anuales en base a los mapas semanales de los 14 años

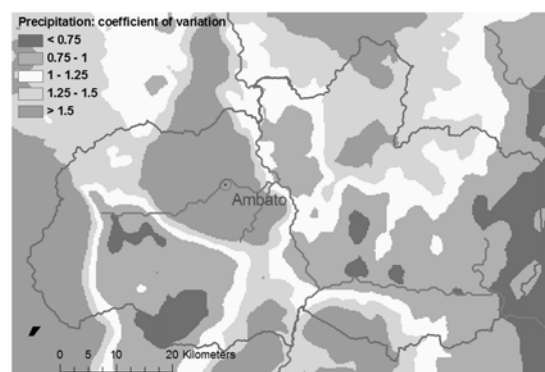


Figura 2. Coeficiente de variación basado en la variación semanal, indicando las diferencias relativas entre períodos húmedos y secos

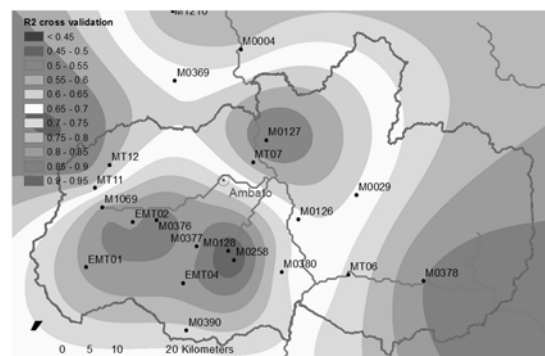


Figura 3. Capacidad de predicción de los modelos de regresión, expresada por el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), y calculado con validación cruzada



## Análisis de sensibilidad en la construcción de ensembles de RCMs de variables meteorológicas

P. Olmos<sup>(1)</sup>, S. García<sup>(1)</sup>, J.D. Giraldo<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Universidad Politécnica de Cartagena, Grupo de I+D+i Gestión de Recursos Hídricos, Unidad Predepartamental de Ingeniería Civil. Paseo Alfonso XIII, 52. 30203. Cartagena, España.  
patricia\_olmos@live.com

<sup>(2)</sup> Pontificia Universidad Javeriana, Departamento de Ingeniería Civil. Bogotá, Colombia.

### RESUMEN

España, por su situación geográfica y características, es uno de los países europeos con mayores problemas ambientales relacionados a la escasez hídrica y las sequías, los cuales se pueden agravar debido al impacto de los usos del suelo y del calentamiento global. En particular, diversos estudios evidencian cambios del ciclo hidrológico en cuencas semiáridas, con tendencias crecientes en las temperaturas, y decrecientes en las precipitaciones, asociadas a una mayor variabilidad climática. Los Modelos Climáticos Regionales (o RCMs por sus siglas en inglés) constituyen una valiosa herramienta para analizar, comprender y predecir las tendencias a medio y largo plazo de las componentes del ciclo hidrológico. Sin embargo, las proyecciones divergentes obtenidas a partir de diferentes RCMs demuestran las muchas incertidumbres asociadas. Las metodologías de combinación de múltiples RCMs (o ensemble en inglés), permiten la cuantificación y reducción de incertidumbres en las proyecciones. En este trabajo se presenta una versión mejorada del método REA (Reliability Ensemble Averaging) diseñado para generar información probabilística sobre el cambio climático a partir de conjuntos de simulaciones de RCMs, en el que el criterio de convergencia se ha eliminado. Se presentan resultados del análisis de sensibilidad de la metodología aplicada para la generación de ensembles, principalmente en temperaturas, en la España Peninsular. Desde los mismos se demuestra que se mejora la fiabilidad de las proyecciones climáticas, y al considerarlas como input a modelos hidrológicos se espera una mayor robustez en las proyecciones hidrológicas.

**Palabras clave:** CDFs; Cambio climático; REA modificado.

### 1. Introducción

Según el Panel Intergubernamental del Cambio Climático, el clima ha cambiado los últimos 100 años. Existe evidencia robusta sobre la intensificación actual y futura del ciclo hidrológico, y es necesario mejorar la habilidad para la monitorización y predicción de impactos asociados con el cambio de los regímenes hidrológicos [1]. En España es prioritario disponer de los mejores escenarios regionalizados posibles de cambio climático futuro, con objeto de poder realizar análisis de riesgos e impactos para determinar las posibles medidas de adaptación.

A pesar de los progresos alcanzados en la modelación climática con los RCMs, aún persisten incertidumbres debidas a la parametrización física, a la resolución espacio-temporal y a la variabilidad interna de los

modelos. Esto indica que una aproximación de tipo combinación de modelos o “ensemble” es necesaria para obtener información robusta sobre el cambio climático (CC), y para estimar adecuadamente las incertidumbres asociadas [2]. Dado que no es posible concluir qué modelo parece el más confiable de entre todos los disponibles, una evaluación global de las proyecciones del cambio climático debería basarse en la información proporcionada por una combinación o ensemble de todos ellos para simular la variabilidad de la temperatura [3]. Estos autores trabajan con Modelos Climáticos Regionales (RCM). Los sesgos se reducen y las simulaciones de los Modelos Climáticos Globales (GCMs) mejoran promediando las cuatro simulaciones de RCMs con las que cuentan [4], lo que sugiere que ensembles de RCMs (forzados por GCMs) ayudan a compensar errores sistemáticos tanto de los modelos

anidados como de los considerados como forzamientos.

Por otro lado, asumir que un modelo es más idóneo para simular la función de densidad de probabilidad (PDF) observada de una variable implica que se tendrá una mayor confianza en las proyecciones de este modelo [5].

Estudios previos han usado el método REA para evaluar el rendimiento de modelos climáticos [6-7]. En la bibliografía se encuentran distintos trabajos [6,8], sobre estimación de PDFs de variables hidrometeorológicas utilizando proyecciones climáticas. Sin embargo, la habilidad del modelo para representar el clima actual no parece ser suficiente para avalar su robustez para simular el clima futuro [6].

El principal objetivo de este trabajo es construir escenarios climáticos plausibles desde RCMs, para amplias zonas geográficas y distintas variables hidroclimáticas (precipitaciones y temperaturas), aplicando una técnica parsimoniosa y robusta de generación de ensembles multimodelo en cada celda de la malla. Asimismo, se estudia la sensibilidad de la metodología aplicada para la generación de los ensemble multimodelo.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Área de estudio

Se trabaja en toda la extensión de la España Peninsular. El clima de España se caracteriza por un gradiente incremental de precipitación en dirección Sureste-Noroeste, con valores de menos de 250 mm/año en el Sureste a mayores valores (1600 mm/año) en el Oeste de los Pirineos, la costa Cantábrica y especialmente en la región de Galicia. Las temperaturas aumentan de Norte a Sur, y en las tierras del interior los valores descienden de poniente a levante. En el interior de la meseta, se registra la mayor amplitud térmica, llegando a 20°C. Enero es el mes con la mínima temperatura media, mientras que Agosto es el mes con el promedio más elevado.

### 2.2 Bases de datos

Considerando la zona de estudio seleccionada, se ha realizado una recopilación de datos mensuales meteorológicos observados, así como aquellos simulados provistos por el Proyecto Europeo ENSEMBLES [9]. Los datos de precipitación, temperatura máxima y temperatura mínima mensual corresponden a los proporcionados por el experimento RT2B del Proyecto Europeo ENSEMBLES para Europa. De

entre todos los modelos disponibles, se trabajó con los diecisiete modelos seleccionados para realizar estudios en España [10]. Esta selección se basó en la resolución espacial (tamaño de celda 25\*25 km), periodo temporal (con datos en el periodo de control 1961-1990), y en evitar sesgar los ensembles. Los RCMs estaban anidados en distintos GCMs, para el escenario A1B.

También se trabajó con la base de datos meteorológicos observados denominada Spain02 (período 1950-2007) de la Península Ibérica, que provee datos de precipitaciones, temperaturas máximas y mínimas diarias con una resolución espacial de 0,2° (~20\*20 km) [11].

### 2.3 Cálculo del PDF ensemble

El método REA (Reliability Ensemble Averaging) [3] proporciona una medida de la fiabilidad, la media y el rango de incertidumbre del cambio climático simulado a partir de conjuntos de diferentes GCMs y RCMs. En este trabajo se presenta una modificación del método original, el método REA modificado [7], con el fin de mejorar algunas limitaciones del enfoque original. Esencialmente se mejora la forma en que se calculan los pesos del modelo. El nuevo modelo abandona el uso del criterio de convergencia a futuro, que cuantificaba la confiabilidad de cada RCM en base a la distancia al “mejor estimado” de la respuesta del clima futuro. Los cálculos del factor de fiabilidad del modelo  $R_i$  están basados en funciones de distribución acumuladas empíricas (e-CDF) estacionales y anual (Eq. 1), y una medida cuantitativa del grado de ajuste entre las funciones de probabilidad. Los e-CDF fueron construidos desde datos observados y RCMs para el periodo de control 1961-1990.

$$R_i = (\text{Invierno}^a * \text{Primavera}^b * \text{Verano}^c * \text{Otoño}^d * \text{Anual}^e)^{1/(a+b+c+d+e)} \quad (1)$$

Donde a, b, c, d y e son parámetros definidos por el usuario. Para identificar los parámetros a aplicar al *ensemble*, es necesario estudiar la similaridad distribucional entre los RCMs y los datos observados, puesto que el sólo uso de la media o desviación estándar no es suficiente para una comparación completa de la variabilidad. Como ejercicio de sensibilidad, vamos a considerar aquí cuatro formulaciones diferentes de los parámetros de REA, correspondientes a distintas combinaciones de los parámetros (Tabla 1). En REA1 todos los parámetros se consideran igual a 1. Este será el caso considerado de referencia.

La métrica para estimar el desempeño de los modelos corresponde al valor  $p$  del test de bondad de ajuste Smirnov-Kolmogorov (SK) para dos muestras [12].

La probabilidad asociada a un cambio simulado por el RCM es proporcional al factor de fiabilidad del modelo  $R_i$ . El factor de fiabilidad normalizado  $P_m$  [6] puede ser interpretado como la probabilidad asociada a cada RCM.

Por último, para la construcción de ensembles, se le dio más peso a los RCM con mayor factor de fiabilidad normalizado  $P_m$ , utilizando técnicas de bootstrapping.

### 3. Resultados y Discusión

Dado que se ha trabajado con más de 900 sitios (celdas) en la España Peninsular, con el objeto de un análisis en detalle de los resultados obtenidos, sólo se presentan resultados en algunos sitios seleccionados. Se ha analizado con mayor detalle en trece puntos distintos de España, el valor  $p$  del test de bondad de ajuste Smirnov-Kolmogorov y el sumatorio del error medio anual del ensemble frente al observado para cada una de las combinaciones (REA1 a REA4) de precipitaciones, temperaturas máximas, mínimas y medias. A modo de ejemplo, se exponen sólo los resultados de un punto (Tabla 2 y Tabla 3) situado al norte de Extremadura. Se destaca que para el caso de la variable temperatura máxima, no se obtienen mejoras apreciables en el valor de  $p$  y el error, para las 3 combinaciones presentadas. Luego en la variable temperaturas mínimas, se observan efectos en la CDF, al considerar las distintas combinaciones. No obstante, desde los resultados obtenidos para las otras variables consideradas (temperaturas medias y precipitaciones mensuales) se aprecia que no hay ninguna combinación de parámetros, de entre las consideradas, que implique una mejora en el ensemble para todos los puntos estudiados. Ello puede deberse a que tanto la precipitación media como la temperatura media, al ser promedios, suavizan los resultados.

Además para identificar qué factores de ponderación presentan los mejores resultados, se ha estudiado la similaridad distribucional entre el ensemble y los datos observados con los CDFs, para los 13 puntos elegidos y cada uno de los casos considerados (REA1 a REA4). En la Figura 1 se presenta el CDF de verano de temperaturas máximas para las 4 opciones de REA. Se ha observado, que en los CDFs en los cuales se deja de tener en cuenta un solo factor de ponderación o dos (REA2, REA3) no se

detecta con claridad sensibilidad en los resultados, los cambios son imperceptibles. Esto también ocurre en el caso de la precipitación media (resultados no mostrados), para cualquier caso de REA, no se aprecia sensibilidad visualmente. Es de subrayar que los cambios en las colas de las distribuciones de temperaturas o precipitaciones, son diferentes en magnitud que los observados.

### 4. Conclusiones

Desde los resultados obtenidos, se concluye que no se puede generalizar pues el comportamiento del modelo propuesto es distinto según la variable analizada (precipitación media, temperatura máxima, media o mínima). Es de destacar, que no se ha encontrado una combinación de parámetros que mejore la de referencia (todos los parámetros son igual a 1). Además con algunas combinaciones de REA, la sensibilidad del modelo es inapreciable. Otros problemas que se presentan a la hora de plantear la generación de un *ensemble* de RCMs, es la selección del escenario de CC, y evitar sesgar el ensemble al considerar distintos RCMs forzados con el mismo GCM. Resulta de interés analizar el impacto que presenta en la ponderación, el forzamiento de distintos GCMs, así como el impacto de distintos escenarios de emisión de gases de efecto invernadero (A1, A2, B1 y B2) (GEI).

### 5. Agradecimientos

Se agradece el soporte recibido desde el proyecto del Plan Nacional CGL2012-39895-C02-01, "Evaluación de la variabilidad hidroclimática desde combinaciones multimodelo climáticas regionales (HYDROCLIM)", financiado por la Secretaría de Estado de Investigación del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), y fondos FEDER.

### 6. Referencias bibliográficas

- [1] Huntington, T. G. 2006. Evidence for intensification of the global water cycle: review and synthesis. *J. Hydrol.*, 319, 83–95.
- [2] Paeth, H., Hall, N.M.J., Gaertner, M., Alonso, M.D., Moumouni, S., Polcher, J., Ruti, P.M., Fink, A.H., Gosset, M., Lebel, T., Gaye, A.T., Rowell, D.P., Moufouma-Okia, W., Jacob, D., Rockell, B., Giorgi, F., and Rummukainen, M. 2011. Progress in regional downscaling of West African precipitation, *Atmos. Sci. Let.*, 12: 75–82. DOI:10.1002/asl.306.

[3] Giorgi F. and Mearns LO. 2002. Calculation of average, uncertainty range, and reliability of regional climate changes from AOGCM simulations via the “reliability ensemble averaging” (REA) method. *J Clim* 15(10):1141–1158.

[4] Diallo I., Sylla M. B. , Giorgi F. , Gaye A. T. and Camara M. 2012. Multimodel GCM-RCM Ensemble-Based Projections of Temperature and Precipitation over West Africa for the Early 21st Century. Hindawi Publishing Corporation. *International Journal of Geophysics*. Volume 2012, Article ID 972896, 19 pages.

[5] Perkins, S. E., Pitman, A. J., Holbrook, N. J., and McAneney, J. 2007. Evaluation of the AR4 climate models’ simulated daily maximum temperature, minimum temperature, and precipitation over Australia using probability density functions. *J. Climate*, 20:4356–4376.

[6] Giorgi F. and Mearns LO. 2003. Probability of regional climate change based on reliability ensemble averaging (REA) method. *Geophys Res Lett* 30(12):311–314

[7] Xu Y., Gao X., Giorgi F. 2010. Upgrades to the reliability ensemble averaging method for producing probabilistic climate-change projections. *Clim Res* 41:61–81.

[8] Wigley, T.M.L. and Raper, C.B. 2001. Interpretation of high projections for global-mean warming. *Science*, 293:451–454.

[9] Christensen J. H., Rummukainen M., and Lenderink G. 2009. Formulation of veryhigh - resolution regional climate model ensembles for Europe. In *ENSEMBLES: Climate change and its impacts at seasonal, decadal and centennial timescales: Summary of research and results from the ENSEMBLES project*, edited by: van der Linden, P. and Mitchell, J. F. B., Met Office Hadley Centre, FitzRoy Road, Exeter EX1 3PB, UK, 47–58.

[10] García Galiano, S. G., Giraldo Osorio, J. D. 2012. Assessing uncertainties in the building of ensemble RCMs over Spain based on dry spell lengths probability density functions. *Clim Dyn*. DOI 10.1007/s00382-012-1381-5

[11] Herrera S., Gutierrez JM., Ancell R., Pons MR., Frias MD., Fernandez J. 2010. Development and analysis of a 50-year high-resolution daily gridded precipitation dataset over Spain (Spain02). *Int J Climatol*. doi:10.1002/joc.2256.

[12] Sheskin DJ. 2000. Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures, 2nd edn. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton

## Tablas y Figuras

**Tabla 1.** Diferentes formulaciones de los factores de ponderación de REA en Eq. 1.

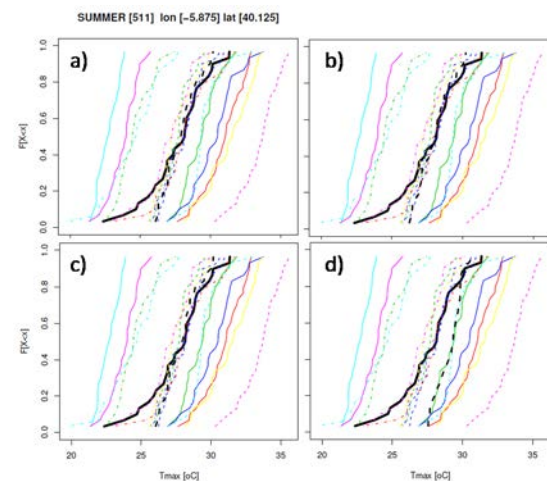
Métodos	Parámetros
REA1	a=1,b=1,c=1,d=1,e=1
REA2	a=1,b=1,c=1,d=1,e=0
REA3	a=0,b=1,c=0,d=1,e=1
REA4	a=0,b=0,c=0,d=0,e=1

**Tabla 2.** Valores de p del test de SK para el sitio 511 y sumatorio del error en valor absoluto del ensemble para Tmax.

p	REA1	REA2	REA3	REA4
In	0.23	0.24	0.39	0.20
Pr	1	0.99	0.95	0.52
Ver	0.61	0.41	0.61	0.009
Ot	0.46	0.47	0.21	0.14
An	0.94	0.95	0.66	0.61
Σ el	3.28	3.51	3.9	8.6

**Tabla 3.** Valores de p del test de SK para el sitio 511 y sumatorio del error en valor absoluto del ensemble para Tmin.

p	REA1	REA2	REA3	REA4
In	0.47	0.48	0.07	0.0006
Pr	0.07	0.21	0.47	3.71e <sup>-5</sup>
Ver	0.008	0.14	0.04	1.16e <sup>-6</sup>
Ot	0.21	0.10	0.13	0.22
An	0.71	0.99	0.99	0.89
Σ el	7.05	6.22	7.03	19.04



**Figura 1.** CDFs de verano de Tmax en el sitio 511 con datos observados (negro), ensemble (negra discontinua) y RCMs (en color) para el periodo 1961–1990: a) REA1; b) REA2; c) REA3 y d) REA4.

## Estimación de la profundidad radicular de cultivos hortícolas a partir de imágenes de la cubierta vegetal para su empleo en gestión del riego

D. Escarabajal-Henarejos <sup>(1)</sup>, J.M. Molina-Martínez <sup>(1)</sup>, G. García-Mateos <sup>(2)</sup>,  
A. Ruiz-Canales <sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> Grupo de Investigación en Ingeniería Agromótica y del Mar. Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena, Murcia. david.escarabajal@gmail.com

<sup>(2)</sup> Departamento de Informática y Sistemas. Facultad de Informática. Universidad de Murcia. Campus Universitario de Espinardo, s/n, 30100 Espinardo, Murcia

<sup>(3)</sup> Departamento de Ingeniería. Área de Ingeniería Agroforestal. Escuela Politécnica Superior de Orihuela. Universidad Miguel Hernández de Elche. Ctra. de Beniel, km 3.2, 03312 Orihuela, Alicante

### RESUMEN

El balance hídrico es una metodología ampliamente utilizada en diversos sistemas de programación automática del riego, básicamente en cultivos intensivos y sistemas de microirrigación. Un aspecto de gran importancia para la aplicación del balance hídrico es conocer la profundidad del sistema radicular de la planta, pues permite acotar el volumen de suelo a considerar en dicho balance. En la mayoría de ocasiones, la evolución real de este parámetro no es considerada, recurriéndose a utilizar valores fijos tabulados o propuestos por la bibliografía, hecho que provoca que los valores considerados no se correspondan con los reales, generando situaciones de estrés hídrico o sobresaturación del perfil del suelo, que afectan al normal desarrollo del cultivo. La profundidad radicular es un parámetro que puede ser estimado a partir de fotografías digitales del dosel vegetal, al observarse una excelente relación entre este parámetro y la fracción de cobertura vegetal, éste último directamente relacionado también con el desarrollo del cultivo y su demanda evapotranspirativa. En base a esta relación, se han obtenido modelos matemáticos para la estimación del espesor de la zona radicular de un cultivo de lechuga variedad 'Little Gem', utilizando la fracción de cobertura vegetal como variable de entrada en el modelo, obtenida a partir del procesamiento informático de imágenes digitales de la cubierta vegetal. Su implantación en un sistema automatizado de gestión del riego permitirá la optimización hídrica, al ajustar el contenido hídrico del suelo a la zona realmente explorada por las raíces.

**Palabras clave:** balance hídrico; fracción de cobertura vegetal; modelo de simulación; fotografía digital; procesamiento de imágenes

### 1. Introducción

Entre los métodos disponibles para conocer el estado hídrico del suelo, el balance hídrico resulta una herramienta fundamental en la ordenación científica de los recursos hídricos y, por lo tanto, para la sostenibilidad productiva y ambiental de la agricultura.

Esta metodología, basada en el equilibrio entre las entradas y salidas de agua en el perfil de suelo explorado por las raíces, ha sido ampliamente utilizada tanto a gran escala, para evaluar la cantidad y disponibilidad de recursos hídricos en cuencas hidrográficas [1], como a nivel de parcela para estimar la disponibilidad de agua para las plantas y llevar a cabo la programación del riego en base al contenido hídrico del suelo [2].

La importancia de realizar un seguimiento del estado hídrico de los cultivos reside en la

posibilidad de poder evaluar en cada momento el consumo hídrico particular del cultivo en cada una de sus etapas y el estado de las reservas en los periodos críticos.

Una variable del desarrollo vegetativo de los cultivos es la profundidad del sistema radicular. Su papel en el balance hídrico viene determinado por la necesidad de conocer el perfil de suelo explorado por el sistema radicular, en el cual es necesario mantener unas condiciones óptimas de humedad para el correcto desarrollo del cultivo [3]. La profundidad radicular está relacionada directamente con la tasa de profundización de las raíces, específica de cada cultivo, y con la textura del suelo, pues ésta determina la resistencia mecánica que ofrece el suelo al desarrollo radicular [4]. La profundidad radicular es una variable de entrada en los sistemas de programación del riego, que suele ser resuelta

mediante el empleo de valores fijos tabulados o propuestos por la bibliografía.

Se ha observado una excelente relación entre la profundidad radicular ( $z$ ) y otro parámetro de desarrollo del cultivo, la fracción de cobertura vegetal ( $F_c$ ). Generalmente, la determinación de  $F_c$  se lleva a cabo mediante el empleo de técnicas de procesamiento digital de fotografías aéreas de la cubierta vegetal [5,6], orientada a estimar los requerimientos hídricos del cultivo, dada su relación directa con el coeficiente de cultivo  $K_c$ , empleado en la determinación de la evapotranspiración de los cultivos según la metodología FAO-56 [7]. Así pues,  $F_c$  también se comporta como una variable capaz de predecir la profundidad radicular de la planta mediante el empleo de un modelo matemático predictivo, dada la buena relación existente entre ambos parámetros. La implantación de este modelo en un sistema automático de programación del riego a tiempo real permitirá un mejor control y distribución del agua de riego, optimizando el recurso agua.

En el presente trabajo se ha desarrollado un modelo matemático capaz de predecir el espesor de la zona radicular de un cultivo de lechuga variedad 'Little Gem' a partir de la fracción de cobertura vegetal, obtenida mediante procesamiento digital de fotografías aéreas de la cubierta vegetal.

## 2. Materiales y Métodos

El presente trabajo se desarrolló sobre cuatro plantaciones comerciales de lechuga variedad Little Gem, (*Lactuca sativa* L. cv. 'Little Gem'), durante los años 2011 y 2012, agrupadas en dos temporadas: dos plantaciones en primavera (de abril a junio) en una finca de 20,4 ha localizada en la pedanía de Pozohondo, provincia de Albacete, España; y dos plantaciones en otoño (de octubre a diciembre) en otra finca de 8,3 ha localizada en San Javier, provincia de Murcia, España.

### 2.1 Diseño experimental

Durante los periodos de observación de cada cultivo, en cada finca se delimitaron 4 parcelas de muestreo, representativas del cultivo, y distribuidas aleatoriamente evitando la zona externa de la plantación para eliminar el efecto borde. En cada parcela de muestreo se midió la profundidad radicular del cultivo ( $z$ ), mediante catas realizadas en el terreno; y se llevó a cabo un seguimiento de la fracción de cobertura vegetal ( $F_c$ ) mediante la obtención de fotografías digitales del dosel vegetal; para ello se utilizó una cámara digital compacta (Coolpix S3300, Nikon, Japón) montada sobre un trípode a una altura fija de 1,40

m sobre el terreno. Como valores ( $z$  y  $F_c$ ) de cada día muestreado, se tomó el promedio de las 4 parcelas.

### 2.2 Obtención del parámetro $F_c$

Para determinar la  $F_c$  a partir de cada fotografía del cultivo, las imágenes obtenidas fueron sometidas a un proceso de clasificación supervisada y posterior proceso de segmentación mediante el empleo del software ENVI® (Environment for Visualizing Images) versión 4.0, desarrollado por Research System Inc. (Boulder, CO, USA) (Fig. 1). Se trata de un moderno sistema de procesamiento de imágenes diseñado para proporcionar análisis multiespectral de datos obtenidos por teledetección desde aviones y satélites. Además, ENVI® proporciona un entorno potente y de fácil uso para presentar y analizar imágenes de cualquier tamaño y tipo de datos en un amplio rango de plataformas con su procesamiento de imágenes, basado en ficheros y bandas.

En el procesamiento digital mediante el software ENVI® de las imágenes de la cubierta vegetal obtenidas en cada una de las parcelas muestreadas, se definieron dos categorías en cada imagen: suelo (beige) y vegetación (verde) (Fig. 1). Para asignar a cada pixel de la imagen su pertenencia o no a las dos categorías definidas (suelo o vegetación) fue necesario asignar estas categorías a cada color de la imagen. De esta forma el resultado final es el número de píxeles correspondientes a vegetación, suelo y totalidad de la imagen. El parámetro  $F_c$  fue obtenido en cada imagen como cociente entre el número de píxeles de color verde y número de píxeles totales.

### 2.3 Ajuste del modelo

Los valores de  $z$  y  $F_c$  registrados durante las plantaciones correspondientes al año 2011, se ajustaron mediante un análisis de regresión no lineal. Para ello se analizaron varias funciones de aproximación, incluyendo el modelo logarítmico, monomolecular, logístico y Gompertz.

El ajuste entre ambos parámetros se llevó a cabo utilizando la herramienta SOLVER de Microsoft Excel, que permite resolver problemas de optimización lineal y no lineal, pudiéndose incluir restricciones enteras sobre las variables de decisión. Como estadígrafo de comparación se utilizó el error cuadrático medio (ECM) y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ). Se seleccionó como solución óptima aquella que proporcionó el mínimo ECM y máximo  $R^2$ .

Las ecuaciones matemáticas obtenidas en el modelo fueron aplicadas posteriormente en las

plantaciones de 2012 para comprobar la bondad del ajuste.

### 3. Resultados y Discusión

El seguimiento de las plantaciones de 2011 permitió obtener la evolución de los parámetros profundidad radicular ( $z$ ) y fracción de cobertura vegetal ( $F_c$ ) (Fig. 2). Se puede comprobar que ambos parámetros describen una curva de crecimiento muy similar, lo que evidencia una buena correlación entre ambas componentes del crecimiento del cultivo. Esto permite definir una función de estimación de la profundidad radicular a partir de los datos de fracción de cobertura.

En la plantación de primavera de 2011, los mejores resultados fueron obtenidos utilizando el modelo logarítmico de aproximación (Fig. 3). Para evaluar el comportamiento de la ecuación obtenida se realizó un análisis de regresión entre los valores de profundidad radicular medidos y estimados obteniendo una pendiente de la recta de regresión muy similar a la unidad (0,981), un coeficiente de determinación  $R^2 = 0,981$  cm y un ECM = 0,649 cm.

Por otra parte, para el caso de la plantación de otoño de 2011, el mejor ajuste entre  $z$  y  $F_c$  se logró utilizando el modelo logístico (Fig. 4). En este caso, el ajuste realizado reportó un análisis de regresión muy similar al realizado para el caso de la plantación de primavera de 2011, una pendiente de la recta de regresión muy similar a 1 (0,994), un coeficiente de determinación  $R^2 = 0,993$  y un ECM = 0,666 cm.

Según lo expuesto, se evidencia que la metodología presenta una fuerte componente de estacionalidad, que condiciona el tipo de función de aproximación. Mientras en la plantación llevada a cabo en primavera, el modelo logarítmico es el que comporta mejor ajuste entre las variables fracción de cobertura vegetal y profundidad radicular, no ocurre lo mismo en la plantación de otoño, en el que el modelo logístico es el que mejor relaciona ambas variables.

Para demostrar la validez de la metodología desarrollada, las ecuaciones obtenidas durante las plantaciones de 2011 fueron aplicadas en condiciones similares durante las plantaciones de 2012 (Figs. 3 y 4). El análisis de regresión lineal llevado a cabo en ambos cultivos reportó una pendiente de recta de regresión lineal muy similar a 1 (1,002 y 0,935, respectivamente para primavera y otoño) y un coeficiente de determinación  $R^2$  de 0,987 y 0,999, respectivamente. En ambos casos, el ECM fue de 0,536 cm y

0,830 cm, valores muy similares a los obtenidos en la plantaciones de 2011.

### 4. Conclusiones

Este artículo desarrolla una nueva metodología para la estimación de la profundidad radicular de un cultivo de lechuga variedad 'Little Gem', basada en técnicas de fotografía digital. El parámetro  $F_c$  fue obtenido mediante el procesamiento informático de fotografías digitales de la cubierta vegetal, y posteriormente relacionado con la profundidad radicular ( $z$ ) mediante diversas funciones de aproximación.

En la plantación de primavera, se logró obtener una ecuación de tipo logarítmico para modelizar la relación entre ambos parámetros ( $F_c$  y  $z$ ). La aplicación de dicha ecuación en el siguiente año, reportó una excelente bondad del ajuste ( $R^2 = 0,987$ ). En el caso de la plantación de otoño, la ecuación obtenida fue de tipo logístico y su aplicación en 2012 también reportó un excelente ajuste ( $R^2 = 0,999$ ), demostrando la validez de la metodología.

Los resultados obtenidos demuestran la fuerte relación existente entre  $F_c$  y  $z$ . Se trata pues, de una metodología basada en dicha relación, pero con una fuerte componente estacional que condiciona el tipo de ecuación que se obtiene, dependiendo de la temporada del ciclo de cultivo.

La metodología propuesta permite desarrollar algoritmos más precisos para riego inteligente, al tratarse de una herramienta analítica de aplicación en sistemas automáticos de riego que proporciona una optimización del beneficio económico del cultivo de lechuga atendiendo al agua consumida, pues el conocimiento de la profundidad radicular en cada momento del desarrollo del cultivo, permite ajustar las prácticas de gestión del riego para mantener condiciones óptimas de humedad únicamente la zona radicular del cultivo.

### 5. Agradecimientos

Los autores agradecen a la Fundación Séneca de la Región de Murcia la financiación de este trabajo de investigación mediante los proyectos 8729/PI/08 y 08754/PI/08.

### 6. Referencias bibliográficas

[1] Carvajal, F., Agüera, F., Sánchez-Hermosilla, J. 2014. Water balance in artificial on-farm agricultural water reservoirs for the irrigation of intensive greenhouse crops. *Agr. Water Manage.* 131: 146-155.

[2] Lafond, J. A., Éliane, B. P., Caron, J., Guillaume, T. R. 2014. Evaluating fluxes in Histosols for water management in lettuce: A comparison of mass balance, evapotranspiration and lysimeter methods. *Agr. Water Manage.* 135: 73-83.

[3] Ma, Y., Feng, S., Song, X. 2013. A root zone model for estimating soil water balance and crop yield responses to deficit irrigation in the North China Plain. *Agr. Water Manage.* 127: 13-24.

[4] Taylor, H., Brar, G. 1991. Effect of soil compaction on root development. *Soil Till. Res.* 19: 111-119.

[5] Calera, A., Martínez, C., Meliá, J. 2001. A procedure for obtaining green plant cover: relation to NDVI in a case study for barley. *Int. J. Remote Sens.* 22: 3357-3362.

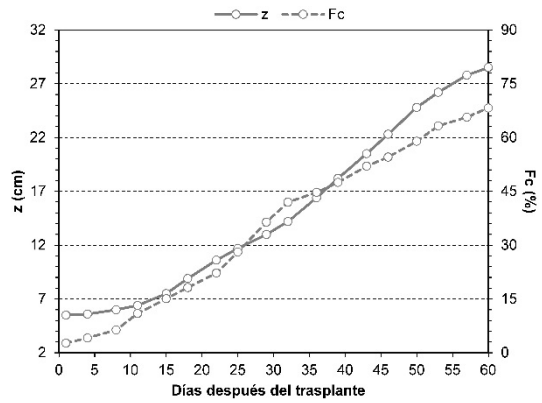
[6] Fernández-Pacheco, D. G., Escarabajal-Henarejos, D., Ruiz-Canales, A., Conesa, J., Molina-Martínez, J. M. 2014. A digital image-processing-based method for determining the crop coefficient of lettuce crops in the southeast of Spain. *Biosyst. Eng.* 117: 23-34.

[7] Allen, R. G., Pereira, L. S., Raes, D., Smith, M. 1998. Crop evapotranspiration: guidelines for computing crop water requirements, FAO. *Irrig. Drain. Paper* 56.

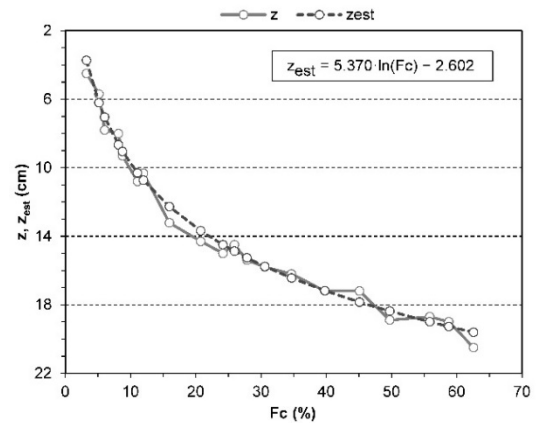
**Tablas y Figuras**



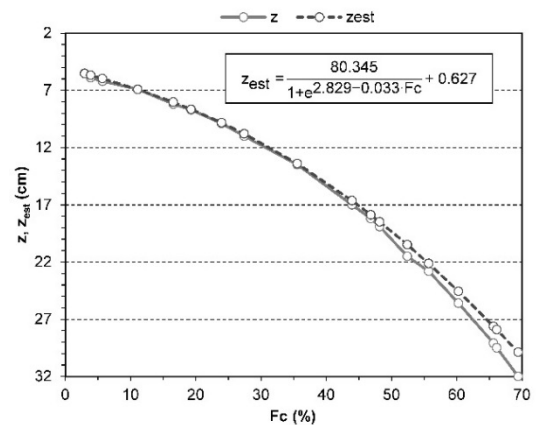
**Figura 1.** Ejemplo de imagen digital del cultivo y su correspondiente bicolor segmentada con el software ENVI® de tratamiento de imágenes.



**Figura 2.** Evolución de la fracción de cobertura vegetal (Fc) y profundidad radicular (z) durante el ciclo de otoño 2011.



**Figura 3.** Relación entre fracción de cobertura vegetal (Fc) y profundidad radicular (z) para valores reales y estimados de z, obtenidos según ecuación logarítmica. Primavera 2013.



**Figura 4.** Relación entre fracción de cobertura vegetal (Fc) y profundidad radicular (z) para valores reales y estimados de z, obtenidos según ecuación logística. Otoño 2013.



# Economic analysis of alternatives for eliminating aquifer overdraft in the Segura basin

D. Martínez-Granados, J. Calatrava

ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII Nº 48, 30203 Cartagena, España.  
david.martinez@upct.es.

## RESUMEN

Aquifer overdraft is a major environmental and water management problem in Southeast Spain. In some coastal areas, the recent development of desalination provides an opportunity to address this problem at a lower social and economic cost. We analyse the economic impact of using several instruments to address this problem in the Alto Guadalentín aquifer: a tax on groundwater pumping, the buyback of groundwater rights and the subsidization of desalinated resources. Their impact is assessed using a mathematical programming model that maximises the farm net margin resulting from the use of the available water resources for irrigation in the area. Our results show that all the alternatives have significant economic impacts, although the availability of desalinated water significantly reduces them. Whereas the outright restriction of non-renewable pumping and an environmental tax have the lowest budgetary cost, they are very unpopular and rather politically unfeasible. Although more expensive for the public budget, purchasing water rights and subsidising desalinated water in exchange for reducing groundwater pumping have the same impact on the agricultural sector, but are likely to be much better received by farmers. Moreover, the former permanently solves the problem.

**Keywords:** groundwater; irrigation; desalinated water; water economics; mathematical programming

## 1. Introduction

Aquifer overdraft is a major environmental and water management problem in Southeast Spain. The expansion of intensive horticulture over the last decades has put pressures on all water resources, especially of groundwater that is a major source of water, causing over-exploitation to reach alarming proportions in many aquifers.

In the Segura basin, the most severe pressures over water resources that difficult accomplishing with the environmental objectives established to comply with the European Water Framework Directive (WFD) are: reduced river flows, non-point source pollution and unsustainable groundwater pumping [1]. The last one is of special social and economic importance because of its severity and the relevance of groundwater for the agricultural sector, one of the most productive and profitable in Europe.

According to the WFD [2], water agencies must propose a set of measures to achieve the environmental objectives in each area. Apart from assessing their potential for achieving the environmental objectives, they must also analyse

their economic impact. The main economic instruments considered by the Segura River Basin Authority are the buyback of water rights and the substitution of over-exploited groundwater resources by desalinated water [1].

Our objective is to analyse the economic impact of several economic instruments that could serve to eliminate aquifer overdraft in the Alto Guadalentín aquifer, one of the most severe cases of groundwater depletion in Spain: the public purchase of groundwater rights, an environmental tax on groundwater pumping and the subsidised substitution of groundwater by desalinated resources. We analyse both the effectiveness of this instruments in achieving such objective, and its impact in terms of public budgetary cost, farm profitability, agricultural production and employment.

## 2. Methodology

### 2.1 Description of the problem and area of study

The Alto Guadalentín aquifer is located in the Guadalentín sub-basin that belongs to the Segura basin in SE Spain. The Guadalentín is one of the

most productive agricultural areas of Spain because of its climate, which ranges between the semi-arid and the Mediterranean, making it an ideal setting for out-of-season horticulture. On the other hand, rainfall is scarce, ranging from 250 to 500 mm, although most of the basin receives less than 350 mm.

Structural water scarcity is especially severe in the Segura, despite of receiving external water resources through the Tajo-Segura Aqueduct (TSA). The huge expansion of irrigation over the last three decades has caused a structural water deficit that positions it as one of the most water stressed basins in the Mediterranean [3]. For information on the physical environment, the agricultural sector and the water budget in the Segura basin, see [4].

According to the Segura River Basin Authority [1], the total irrigation area in the Alto Guadalentín aquifer is 36,026 hectares, of which 21,107 hectares are irrigable. Agricultural water demand accounts for 116.42 Mm<sup>3</sup>/year, while theoretical water availability is 94.26 Mm<sup>3</sup>/year, including several sources of water (Table 1). This unbalance between resources and demands is in fact greater. The official data on water resources availability is merely theoretical, based on existing rights and concessions, and serves only for planning purposes. In practice, using data from [5], effectively available resources are estimated at 74,35 Mm<sup>3</sup>/year, leaving the new desalinated resources aside (Table 1).

Available resources for irrigation only cover 64% of water demand, the latter exceeding the former by 42.1 Mm<sup>3</sup>/year. Such deficit is covered with a deficit application of water to crops and a reduction in the irrigated area. However, as 27.6 out of 74.35 Mm<sup>3</sup>/year of available resources are non-renewable pumping of groundwater, such water deficit is in fact greater. If only 46.75 Mm<sup>3</sup>/year of renewable resources were used, they would cover only 40% of the agricultural water demand.

The massive use of groundwater resources during the last decades has caused the severe depletion of the Alto Guadalentín aquifer [1]. To address this problem, the river basin authority has proposed several measures [1]: a management plan to reduce extraction quotas and to control pumping over the quotas, which has not been approved yet because of its great economic impact; the compulsory purchase of groundwater rights; substituting groundwater by desalinated resources.

## 2.2 Economic instruments considered

In accordance with the previous discussion, the instruments that we analyse are: (i) Purchasing groundwater rights and concessions to reduce pressure over the aquifer; (ii) An environmental tax on groundwater to reduce extractions; (iii) Substituting non-renewable groundwater resources by subsidised desalinated ones.

Purchasing water rights has the advantage of permanently reducing extractions and is less conflictive than consumption quotas and other command and control policies, but it has both a high public budgetary cost and significant impacts on the rural economy.

As the purchase of rights, the substitution of groundwater by desalinated seawater is also considered by the CHS in the set of measures to eliminate aquifer depletion [1]. However, the CHS does not take into account the large differences in their cost for farmers. It is very unlikely that they will substitute groundwater with a more expensive resource without having any incentive to do so. We have thus incorporated a subsidy for desalination subject to a reduction in groundwater extractions. However, as desalination plants are already built or being built, farmers will also have access to non-subsidised desalinated water.

On the other hand, setting an environmental tax on groundwater extractions is a very unpopular measure. In any case, should it be applied, it is very politically unlikely that a tax high enough to promote a sustainable groundwater use could be set. We consider it because it provides revenue for the government, instead of putting pressure on public budgets, although we recognise the difficulty of its implementation.

Last, we also consider the prohibition of non-renewable extractions, an option that has been considered but never implemented by the water authority because of its high political cost. It is less conflictive and more effective to purchase water rights or provide alternative resources. However, we have included it to measure its economic impact, i.e. the economic contribution of non-renewable extractions.

## 2.3 Economic assessment of the impact of each instrument

The economic impact of each instrument is assessed using a mathematical programming model that maximises agricultural net margin derived from using the different sources of water supply available for irrigation in each area under different water availability scenarios and economic instruments. The economic data used in

the model comes from [4] and [5]. For reasons of space we do not show the model's equations, but these are available from the authors upon request.

The model is run independently for each instrument to obtain the optimal use of water from each source and four economic indicators (farm net margin, agricultural production, agricultural employment and public budgetary cost) that allow assessing each instrument.

### 3. Results and Discussion

First of all, results for the **"no intervention" scenario** show that, because of the high water demand in the area, and despite their relatively high price, a proportion of the available desalinated resources are used, specifically 7.44 out of 28.0 Mm<sup>3</sup> (second column in Table 2). However, this increased use of desalination does not result in a reduction of groundwater extraction because of the severe existing water scarcity. Neither does it result in all the available desalinated water being used, as it is far more expensive for farmers than other resources. In this situation, the value of agricultural production generated is nearly 202 million euros/year, farm net margin is 64.6 million euros/year and agricultural employment is 126,3 million days per year.

Restricting groundwater pumping to the level of aquifers' recharge by **forbidding non-renewable pumping** has a lower impact than it could be anticipated, as farmers can partly substitute groundwater for desalinated resources. As shown in the third column of Table 2, this alternative reduces agricultural production by 12.5 million euros/year (a 6.2% reduction), farm net margin by 6 million euros/year (a 9.2% reduction) and agricultural labour by 114,000 days/year (a 9% reduction). The availability of desalinated water partly offsets the negative impact of this option on the agricultural sector.

Similarly, the **purchase of groundwater rights** has a lower impact than anticipated, as farmers can substitute the sold groundwater rights for desalinated resources (fourth column of Table 2). A price of 0.38 euros/m<sup>3</sup>/year, measured as an annual equivalent cost, would be required to buyback enough water rights to eliminate non-renewable pumping. The impact in terms of agricultural production and labour is the same as in the previous case, as the total water use is identical. On the other hand, the purchase of water rights increases farm net margin by 4.5

million euros/year (7.6%) but incurring in an annual budgetary cost of 10.5 million euros.

As expected, the effectiveness of the **environmental tax on groundwater extraction** is reduced because of the low water demand elasticity, and a high environmental tax of 0,38 euros/m<sup>3</sup>/year would be required to eliminate non-renewable pumping. The tax has the same impact in terms of lost agricultural production and employment (fifth column of Table 2) as the purchase of groundwater rights but, unlike the latter, it notably reduces farmers' net margin (a 14.4%). On the other hand, public revenue from the tax is 3.33 million euros per year. In Table 2, we can see that the environmental tax has a greater impact in terms of farm net margin than the prohibition of non-renewable pumping.

In principle, **subsidising desalinated water in exchange for reducing groundwater pumping** has the advantage over the purchasing water rights or restricting pumping of not reducing water use and therefore not having any impact on the agricultural sector. However, the fact that farmers already have access to desalinated water, even at a higher price than groundwater, offsets the effectiveness of subsidising its price, as these resources are already available without the subsidy and will be used if the proper incentives are provided with any of the other instruments. As a result, although the amount of water used in the area is reduced with respect to the "no intervention" alternative, it is still the same than with the other instruments, and the impact of this instrument is identical to that of the public purchase of groundwater rights.

### 4. Conclusions

In this study we analyse the economic impact of several economic instruments that can be used to face the severe problem of unsustainable groundwater pumping in the Alto Guadalentín aquifer in Southeast Spain, one of the most profitable agricultural areas in Europe.

Our results show that demand for desalinated water accounts for a quarter of its availability, despite its high price. However, desalination alone does not reduce groundwater pumping because of the severe water scarcity in the area. This is a relevant result, as it shows that, just by making it available to farmers, groundwater extractions will not be reduced.

The availability of desalinated water mitigates the relevant economic impact of eliminating aquifer overdraft using any of the instruments, as farmers can substitute groundwater with desalination.

Choosing the right one thus depends on the importance given to its impact on the farming sector and on the public budget.

Although the outright restriction of non-renewable pumping and the tax on extractions have the lowest budgetary cost, they are very unpopular and quite politically unfeasible, as experiences in other Spanish basins have shown.

Despite being more expensive for the public budget, the buyback of water rights and the subsidisation of desalinated water in exchange for reducing groundwater pumping have the same impact on the agricultural sector, but are likely to be much better received by farmers. Moreover, the former permanently solves the problem. The solution could be a combination of instruments that would share the cost among farmers and the administration with the lowest possible impact on the agricultural sector.

## 5. Acknowledgements

The authors thank the Spanish National Institute for Agricultural and Food Research and Technology (INIA) and FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional) for their support through the research project RTA2010-00109-C04-03.

## 6. References

- [1] CHS. 2008a. Esquema provisional de temas importantes de la Demarcación Hidrográfica del Segura. Confederación Hidrográfica del Segura, Murcia, Spain.
- [2] EC. 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. European Commission. OJ L 327, 22.12.2000, p. 1–73.
- [3] Maestre-Valero, J.F., Martínez-Granados, D., Martínez-Alvarez, V., Calatrava, J. 2013. Socio-economic impact of evaporation losses from reservoirs under past, current and future water availability scenarios in the semi-arid Segura basin. *Water Resour Manag* 27: 1411-1426.
- [4] Martínez-Granados D., Maestre-Valero J.F., Calatrava J., Martínez-Alvarez V. 2011. The economic impact of water evaporation losses from water reservoirs in the Segura basin, SE Spain. *Water Resour Manag* 25: 3153-3175.

[5] CHS. 2006. Plan de Actuación en Situaciones de Alerta y Eventual Sequía en la Cuenca del Segura. Confederación Hidrográfica del Segura, Murcia, Spain.

## Tables and Figures

**Table 1.** Available water resources and water cost in the Alto Guadalentín aquifer

	Available water rights (Mm <sup>3</sup> /yr)	Available water (Mm <sup>3</sup> /yr)	Cost of water for farmers (€/m <sup>3</sup> )
Surface water	13.90	11.10	0.05
Tajo-Segura Transfer	37.16	22.25	0.127
Treated wastewater	4.70	4.70	0.08
Groundwater	38.50	36.30	0.24
Desalinated water	-	28.0	0.445
<b>Total resources</b>	<b>94.26*</b>	<b>74.35*</b>	
Non-renewable pumping (Mm <sup>3</sup> /year)		27.60	

Source: Own-elaboration using data from [1], [5] and a survey made in 2012 to irrigation districts in the area. Groundwater resources include infiltration from water applications to crops.  
\* Excluding desalinated resources.

**Table 2.** Economic impact of eliminating aquifer overdraft using each instrument

	No intervention	Prohibition of non-renewable pumping	Purchase of rights (0.38 €/m <sup>3</sup> /yr)	Environmental tax (0.38 €/m <sup>3</sup> /yr)	Subsidy to desalination (0.38 €/m <sup>3</sup> /yr)
Total water use (Mm <sup>3</sup> /yr)	81.88		74.44 (-9.09%)		
Groundwater use (Mm <sup>3</sup> /yr)	36.32		8.72 (-76%)		
Reduction in Groundwater use (Mm <sup>3</sup> /yr)	0.00		27.60		
Desalinated water use (Mm <sup>3</sup> /yr)	7.44		27.60		
Subsidised desalinated water use (Mm <sup>3</sup> /yr)	0.00		0.00		27.60
Agricultural production (million euros/yr)	201.97		189.51 (-6.17%)		
Net margin (million euros/yr)	64.59	58.62 (-9.24%)	69.11 (7%)	55.30 (-14.4%)	69.11 (7%)
Agricultural employment (10 <sup>4</sup> million days/yr)	126.26		114.87 (-9%)		
Budgetary cost (million euros/yr)	0.00	0.00	10.47	-3.33	10.47

Source: Own elaboration. Proportional change with respect to the “no intervention” alternative in brackets

## Diseño y puesta en marcha de una Infraestructura de Datos Espacial sobre Agricultura y Agua

M. Erena <sup>(1)</sup>, S. García <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> IMIDA, C/ Mayor s/n, 30.150. La Alberca. Murcia.

<sup>(2)</sup> Universidad Politécnica de Cartagena, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, España

### RESUMEN

La integración de múltiples fuentes de datos espaciales es esencial para el desarrollo de los servicios públicos en todos los dominios temáticos, los datos son suministrados y a la vez consumidos por todos los niveles de la administración. Actualmente, la demanda de datos interoperables está creciendo enormemente entre los gestores del agua para buscar soluciones más eficaces a la gestión o la planificación de este recurso tan importante y escaso, para lo cual se necesita integrar una gran cantidad de datos de carácter geográfico de diferentes procedencias y resoluciones. Sin embargo, a menudo es muy difícil poder integrar conjuntamente la información geográfica disponible para un mismo territorio y temática. Esto es debido a la gran diversidad de modelos de datos, las diferentes especificaciones y los diversos tipos de conectores que utilizan las organizaciones que tienen competencias en un mismo territorio. Para superar estas limitaciones, los organismos deben adoptar unas normas comunes para facilitar la reutilización de los datos espaciales, unas especificaciones estándares y un acuerdo de intercambio de datos basado en sus necesidades, pero que permita compartir estos datos con otras organizaciones. Por esta necesidad están surgiendo las Infraestructuras de Datos Espaciales (IDE o su acrónimo en inglés SDI Spatial Data Infrastructure) en los diferentes dominios temáticos, y para su armonización la UE ha desarrollado la directiva INSPIRE, que proporciona un marco global con una serie de recomendaciones tecnológicas que permiten superar los problemas de la integración de datos desde múltiples fuentes y propósitos.

**Palabras clave:** Metadatos; Interoperabilidad; Internet; Inspire

### 1. Introducción

El término Infraestructura de Datos Espaciales, fue acuñado por primera vez en 1993 por el U.S. National Research Council para referirse a un marco de tecnologías, políticas y disposiciones institucionales que, trabajando conjuntamente, facilitan la creación, el intercambio y el uso de los datos geoespaciales y de los recursos de información relacionados, a través de un sistema distribuido de información. Posteriormente, en el año 1994, el gobierno de EE.UU. crea la NSDI (National Spatial Data Infrastructure) y ese mismo año se funda el Open GIS Consortium, que posteriormente se denominó Open Geospatial Consortium (OGC), 13 años después la UE aprueba la Directiva 2007/2/CE, Infraestructure for Spatial Information in Europe-INSPIRE [1] que se desarrolla en España mediante la Ley 14/2010, sobre las infraestructuras y los servicios de información geográfica en España-LISIGE [2].

Las Infraestructuras de Datos Espaciales temáticas, como la propuesta sobre la agricultura y el uso del agua en la Región de Murcia (IDEarm) tienen como objetivo principal el integrar a través de Internet los datos, metadatos, servicios e información de tipo geográfico que sobre esta temática se producen en el ámbito Regional, facilitando a todos los usuarios la localización, identificación, selección y acceso a tales recursos, a través de un geoportal (<http://www.idearm.es>), que además, integrara los recursos interoperables de productores de información geográfica a nivel UE, nacional, regional y local Fig. 1 [3].

Unos de los objetivos específicos de esta trabajo es el de elaborar un inventario de recursos de la información geográfica temática, disponible en el ámbito regional que se actualice utilizando los estándares de interoperabilidad propuestos por la OGC, y que sirva de base para implementar la directiva INSPIRE en este ámbito temático.

### 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Inventario de recursos

La fase de recopilación y producción de la cartografía básica necesaria para implementar la IDEarM se ha basado en los trabajos previos realizados en el IMIDA para la elaboración de la cartografía 1:25.000 del sistema de información de Ocupación del Suelo-SIOSE en la Región de Murcia, de los años 2005, 2009 y 2011, para los cuales se ha tenido que convertir toda la cartografía agraria y de usos del suelo disponible al sistema geodésico de referencia ETRS89 y al sistema cartográfico de representación la proyección UTM, para ellos se ha contado con la colaboración del Instituto Geográfico Nacional y del servicio cartográfico regional de Murcia.

### 2.2 La Interoperabilidad de la información

La interoperabilidad puede definirse de diferentes formas. Por ejemplo el Instituto de Ingenieros Eléctricos y Electrónicos [4] define la interoperabilidad como la habilidad de dos o más sistemas para intercambiar información y utilizar la información intercambiada. Según la iniciativa Dublin Core [5] se define como la capacidad de los distintos tipos de ordenadores, redes, sistemas operativos y aplicaciones informáticas, para trabajar conjuntamente de una forma efectiva, sin requerir comunicaciones previas, de modo que se intercambie información de un modo útil y válido.

En el contexto de las IDE los principales actores que están desarrollando los estándares de interoperabilidad de los datos y sistemas son el OGC y la Organización Internacional de Estandarización -ISO. Ambos, además de definir normas para los datos y los metadatos, están definiendo modelos de objetos y esquemas XML (eXtensible Markup Language) para el almacenamiento y la transferencia de información, así como para las interfaces de servicios, por ejemplo la ISO 19128 basándose en la especificación del OGC.

Por otra parte ISO en su norma ISO19119, define la interoperabilidad geográfica como la capacidad de los sistemas de información para intercambiar libremente todo tipo de información espacial relacionada con la tierra, los objetos y los fenómenos que existen encima, debajo y sobre la superficie terrestre, y ejecutar programas capaces de manejar dicha información de forma cooperativa, sobre redes de comunicaciones.

La interoperabilidad para ser efectiva puede tener diferentes aspectos: sintácticos, estructurales o semánticos [6].

Se habla de una interoperabilidad sintáctica cuando hay posibilidad de conexión técnica. Se habla de una interoperabilidad estructural cuando se hace referencia a su representación, identificación, licenciamiento y control de los

datos. Y se habla de una interoperabilidad semántica cuando, además de transmitirse los datos, los sistemas entienden los significados de los datos compartidos.

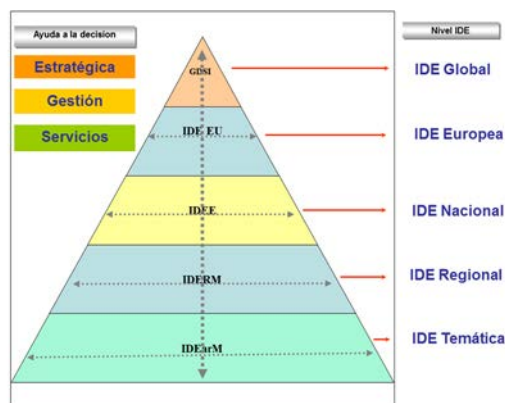


Figura 1. Estructura jerárquica IDEarM, adaptado de Rajabifard [3]

### 2.3 Los metadatos

Los metadatos informan a los usuarios sobre la disponibilidad de datos y de sus características, para que puedan seleccionar qué datos les interesan y que sean capaces de explotarlos de la manera más eficaz posible [7]. Para ello la información incluida en los metadatos debe incluir al menos: la fecha de los datos, el contenido, la extensión que cubren, el sistema de referencia espacial, el modelo de representación espacial de los datos, su distribución, restricciones de seguridad y legales, frecuencia de actualización y calidad. Los objetivos de los metadatos son:

- La búsqueda de conjuntos de datos: saber qué datos existen, qué datos hay disponibles de una cierta zona, de un tema determinado, a una escala, de una fecha o en general de unas características específicas.
- La elección: es decir, poder comparar distintos conjuntos de datos entre sí, de modo que se pueda seleccionar cuáles cumplen los requisitos del usuario de manera más adecuada para el propósito perseguido.
- La utilización: que consiste en describir las todas características técnicas de los datos, de la manera más objetiva, más amplia y completa, con la finalidad de permitir su explotación eficaz.

Para que un metadato cumpla adecuadamente su función, deben de estar contenido en un servicio de catálogo interoperable (CSW), que permita la publicación y búsqueda de los metadatos que describen los datos, servicios, aplicaciones y en general todo tipo de recursos. Los servicios de catálogo son imprescindibles para proporcionar

capacidades de búsqueda e invocación sobre los metadatos registrados dentro de una IDE.

### 2.3 Los datos y su visualización

La forma de visualizar los datos más extendidos son los servicios web de mapas WMS del OGC, produce mapas de forma dinámica a partir de información geográfica.

### 2.4 Caso piloto de interoperabilidad de datos meteorológicos

Para analizar la problemática de la interoperabilidad se han utilizado un conjunto de datos meteorológicos [8,9], procedentes de redes de sensores de la Región de Murcia, la AEMET que aporta los datos de 32 estaciones, la CHS aporta los datos de 52 y el IMIDA aporta los registros de 48, la IDE de la Región de Murcia aporta los datos cartográficos básicos, la Dirección General de Catastro aporta los límites de la propiedad. Para facilitar la interoperabilidad se han desarrollado una serie de servicios encadenados a partir de los cuales se obtienen nuevos productos, como la intensidad de lluvia horaria para el conjunto de los 132 sensores, que son publicados automáticamente mediante un servicio interoperable OGC.

## 3. Resultados y Discusión

Del proceso de inventario se encuentran disponibles los siguientes recursos.

**Tabla 1.** Nivel jerárquico de la información.

Jerarquía	Capas	Metadatos	Servicios
Global	12	24	12
EU	23	46	23
Nacional	1.011	1.636	625
Regional	4.864	4.963	99
Local	815	856	41

A partir del análisis tecnológico realizado, se propone un esquema básico de interoperabilidad basado en las recomendaciones de INSPIRE, que detallarán los requisitos, la metodología de integración de datos, las barreras técnicas y no técnicas de integración de datos espaciales, la jurisdicción de las consideraciones específicas para la integración de datos espaciales. El modelo de integración de datos elegido se basará en caracterización de los fenómenos geográficos utilizando modelos de datos conceptuales, metadatos estructurados y especificaciones definidas por INSPIRE. Las especificaciones de metadatos, que han de contener una descripción conceptual del dato, las relaciones lógicas y las limitaciones existentes entre las diferentes características espaciales, permitirán una extracción automática de información, que será

un paso significativo hacia la integración efectiva de múltiples y heterogéneas fuentes de datos espaciales.

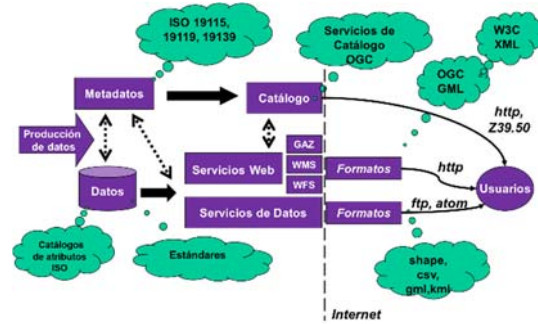


Figura 2. Esquema básico de Interoperabilidad, adaptado de FGDC [12]

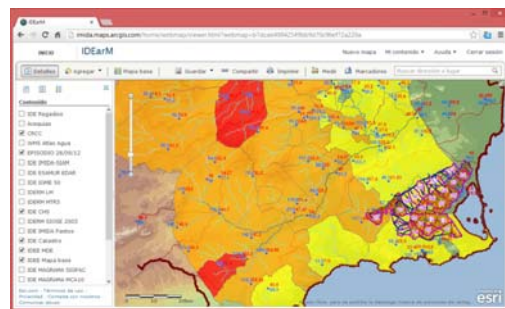


Figura 3. Resultados de la Interoperabilidad de datos meteorológicos [9].

## 4. Conclusiones

La necesidad de reutilización de la información, hace necesario el modelado de datos según la normativa ISO 19101. Otra necesidad, es el uso de protocolos de estandarización ISO y OGC, ya que son claves para lograr una interoperabilidad efectiva que permita el desarrollo de servicios encadenados que convertirán a las IDE en verdaderos sistemas de ayuda a la decisión en la gestión administrativa o la planificación estratégica.

Otra recomendación importante, es el uso de sistemas que permitan intercambiar datos espaciales estandarizados como el GML, lenguajes de marcado derivado del XML. De esta forma se asegura el intercambio de datos entre los diferentes actores involucradas en la transferencia de información espacial.

Por otro lado, se hace evidente la necesidad de un modelo de datos normalizado como el propuesto por INSPIRE para hacer posible el encadenamiento de la información geográfica en todas áreas temáticas, de forma que esta pueda ser reutilizada por otros usuarios y aplicaciones. Otra parte importante de este trabajo es la elaboración de unas recomendaciones

tecnológica y el plan de implementación de la directiva INSPIRE que facilitara la explotación de las bases de datos geográficas disponibles. Las recomendaciones a definir, detallarán los requisitos, la metodología de integración de datos, las barreras técnicas y no técnicas de integración de datos y los aspectos legales. El modelo de integración de datos se basará en los significados de los fenómenos geográficos utilizando modelos de datos conceptuales, metadatos estructurados y legibles vía código, y la especificación de datos espaciales definidas en INSPIRE. Las especificaciones de metadatos, contendrán una descripción conceptual, relaciones lógicas y una descripción de las limitaciones existentes, así como una extracción automática de información que será un paso significativo hacia la integración efectiva de múltiples fuentes heterogéneas de datos espaciales en las IDE temática sobre agricultura y agua, al igual que se ya se ha realizado en otros dominios temáticos como el medio ambiente costero [11] o la hidrología superficial [12].

### 5. Agradecimientos

Al equipo de SIGyT del IMIDA por la ayuda técnica recibida, a los proyectos Telerieg del programa SUDOE y REDSIM de la D. G de Medio Ambiente de la EU por la financiación de los trabajos realizados.

### 6. Referencias bibliográficas

- [1] INSPIRE, 2007. "Directive 2007/2/EC, Official Journal of the European Union, ISSN 1725-2555, L 108, Volume 50, 25 April 2007 (<http://www.ec-gis.org/inspire/>)
- [2] LISIGE, 2010. Ley 14/2010, de 5 de julio, sobre las infraestructuras y los servicios de información geográfica en España.
- [3] Rajabifard, A. 2002. Diffusion of Regional Spatial Data Infrastructures: with particular reference to Asia and the Pacific. PhD Thesis, University of Melbourne, Australia.
- [4] IEEE, 1990. Institute of Electrical and Electronics Engineers. IEEE Standard Computer Dictionary: A Compilation of IEEE Standard Computer Glossaries. New York, NY: 1990.
- [5] Dublin Core, 2006: Dublin Core Metadata initiative. Making it easier to find information. 2006. <<http://www.dublincore.org/>>
- [6] Lemmens R. 2006. Semantic interoperability of distributed geo-services. PhD Thesis. International Institute for Geo-Information Science and Earth Observation. ITC. Holanda.
- [7] Manso M.A. 2009. El uso de los metadatos para el desarrollo de un modelo de interoperabilidad para las Infraestructuras de datos espaciales. Tesis doctoral. UPM.
- [8] Gutiérrez Corea, F.V. y Manso Callejo, M.Á. y Moreno, F.J. y Soler García, C. 2010. Rayman: Interoperability use of Meteorological Observation, In: 1st International WebMSG 2010, Como, Italia.
- [9] Erena M., López J.A., García P., Caro M., Belda F., Palenzuela J.E., Toledano F., Torralba P., González-Barbera G., García-Pintado J. 2012. Estimación de precipitación combinada radar-pluviómetros y publicación mediante servicios OGC. XV CNTIG. CSIC. 2012.
- [10] FGDC. 2012. Geospatial Metadata Standards. Accessed: 30 April. 2012. <http://www.fgdc.gov/>
- [11] Sheikheslami S. 2010. Building a Seamless SDI Model for Land and Marine Environments. Doctoral Thesis. University of Melbourne
- [12] Vilches L. M. 2011. Metodología para la integración basada en ontologías de información de bases de datos heterogéneas en el dominio hidrográfico. Tesis Doctoral. UPM



## Reference evapotranspiration of screenhouse-grown crops

E. Kitta<sup>(1)</sup>, A. Baille<sup>(2)</sup>, N. Katsoulas<sup>(1)</sup>, N. Rigakis<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Centre for Research and Technology Hellas, Institute for Research and Technology of Thessaly, Dimitriados 95 & P. Mela, 38333, Volos, Greece. eva.kitta@gmail.com

<sup>(2)</sup> Universidad Politécnica de Cartagena, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Área de Ingeniería Agroforestal, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, España.

### ABSTRACT

The reference evapotranspiration  $E_{ref}$  was measured under three screenhouses and compared to outside  $E_{ref}$ . The reduction with respect to outside  $E_{ref}$  was quantified by means of two factors,  $\zeta_{rad}$  and  $\zeta_{adv}$ .  $\zeta_{rad}$  was found to depend linearly on transmittance ( $\tau$ ), and  $\zeta_{adv}$  on wind ratio ( $\omega$ ). A model was proposed for screenhouse  $E_{ref}$  based on outside weather data,  $\tau$  and  $\omega$

**Palabras clave:** Solar radiation, net radiation, transmittance, advective component, radiative component

### 1. Introduction

Screenhouses, also called net-houses, are becoming popular among growers in arid and semiarid regions like the Mediterranean area, due to the environmental, economic and agronomic benefits they offer [1]. Insect proof screenhouses are environmental friendly as they reduce the amount of chemical inputs in pesticides and their associated costs, health risks for workers and potential environmental pollution [2]. Economically, screenhouses have lower cost compared to conventional greenhouses [3]. The reduction of solar radiation due to net-covering allows alleviating conditions of stress-induced limitations of the physiological fluxes [4] which are a major constraint in the productivity and quality of greenhouse-grown crops. The positive impact of a net-covering on plant behaviour can be mostly explained by the more favourable microclimate under a screenhouse than outdoors.

In particular, the reduction in both radiation load (net radiation) and wind speed due to the presence of the cover material leads to a reduction of the climatic demand with respect to the open field. This reduction of the climatic demand – generally expressed in terms of the evapotranspiration of a reference crop,  $E_{ref}$ , as proposed by the FAO [5], hereafter FAO-56-PM method - leads to a concomitant reduction of the actual evapotranspiration rate of screenhouse crops with respect to the open field. This was demonstrated by several studies performed in the last decade [6, 7],

However, whereas irrigation scheduling of open field crop by means of the calculation of the

FAO-56-PM method and subsequent application of a crop coefficient ( $K_c$ ) is used worldwide, it is not possible to apply this method to screenhouse crops, because the calculation of the crop net radiation,  $R_n$ , is based on formulae that are valid only for open field conditions. In particular,  $R_n$  of a screenhouse crop differs substantially from that of an open field crop, due to the presence of the cover, which changes both the net short-wave and net long wave radiation. To overcome this problem, we propose in this study to investigate the links between the advective and radiative components of  $E_{ref,in}$  and  $E_{ref,out}$  with the aim to propose a simple model of  $E_{ref,in}$  based only on outside climate inputs. The specific objectives were to:

(i) demonstrate that the radiative component of  $E_{ref,in}$  is mainly driven by the screenhouse global transmittance ( $\tau$ ), and the advective component by the screenhouse wind ratio ( $\omega$ ), and

(ii) use these findings to formulate and test the performance of a  $E_{ref}$ -model that enables predicting  $E_{ref,in}$  from the radiative and advective components of  $E_{ref,out}$  and from the knowledge of  $\tau$  and  $\omega$ .

### 2. Materials and Methods

#### 2.1 Screenhouse and open field facilities

The experiments were performed in three experimental flat roof screenhouses, with the longer dimension oriented N–S, (36° declination

clockwise from North), located at the University of Thessaly near Volos (Velesino: Latitude 39° 22', longitude 22° 44', altitude 85 m), on the continental area of Eastern Greece. The three screenhouses were 20 m long, 10 m wide and 3.2 m high.

Three screens were tested. Two were insect-proof (IP) screens manufactured by Meteor Ltd., Israel: (1) a pearl 50 mesh (20/10) AntiVirus™ screen, hereafter IP-1; and (2) a white 50 mesh BioNet™ (BN), hereafter IP2. The third one was a green shade screen (Thrace Plastics C S.A. Xanthi, Greece) hereafter GS. The insect proof nets have a regular mesh netting of 0.27mm x 0.27 mm, while the green shading net, due to its different knitting, present meshes that are irregular in size and arrangement, with dimensions varying in the range 0.5 mm to 3.0 mm.

Sweet pepper plants (*Capsicum annuum L.*, cv. Dolmi) were transplanted in the three screenhouses and in open-field on May 7, 2012. Plants were laid out 0.5 m apart in the row, in five double rows with a distance between the double rows of 1.2 m, resulting in a plant density of 1.8 plants per m<sup>2</sup>.

## 2.2 Climate data

The following climatic data were continuously monitored outside (University weather station, 100 m distant of the screenhouses) and in the centre of each screenhouse: air temperature and relative humidity, solar radiation, net radiation and wind speed.

## 2.3 Calculations

The daily reference evapotranspiration  $E_{ref}$  (mm day<sup>-1</sup>) was calculated by means of the FAO-56 Penman–Monteith equation [5], using the outside and inside measured meteorological data of air temperature ( $T_a$ ) and vapour pressure deficit ( $D_a$ ), net radiation ( $R_n$ ) and wind speed,  $W$ . The daily integral of soil heat flux was assumed to be zero, leading to the following expression for  $E_{ref}$ :

$$E_{ref} = \frac{0.408\Delta R_n + \gamma \frac{900}{T_a + 273} WD_a}{\Delta + \gamma(1 + 0.34W)} \quad (1)$$

where  $\Delta$  is the slope of water pressure curve and  $\gamma$  is the psychrometric constant, both in kPa °C<sup>-1</sup>.

The use of Eq. 1 implicitly implies that crop albedo was fixed at 0.23, aerodynamic resistance  $r_a$  (s m<sup>-1</sup>) was equal to 208/ $W$ , and bulk surface resistance,  $r_c$ , was 70 s m<sup>-1</sup>. The radiative and advective components of  $E_{ref}$  were defined respectively as:

$$E_{rad} = \frac{0.408\Delta R_n}{\Delta + \gamma(1 + 0.34W)} \quad (2a)$$

and

$$E_{adv} = \frac{\gamma \frac{900}{T_a + 273} WD_a}{\Delta + \gamma(1 + 0.34W)} \quad (2b)$$

The ratios of screenhouse  $E_{rad}$  and  $E_{adv}$  (subindice 'in') to the respective outside values (subindice 'out') were calculated as:

$$\zeta_{rad} = E_{rad,in}/E_{rad,out} = \text{radiative reduction factor}$$

$$\zeta_{adv} = E_{adv,in}/E_{adv,out} = \text{advective reduction factor}$$

$$\zeta_{tot} = E_{ref,in}/E_{ref,out} = \text{overall reduction factor}$$

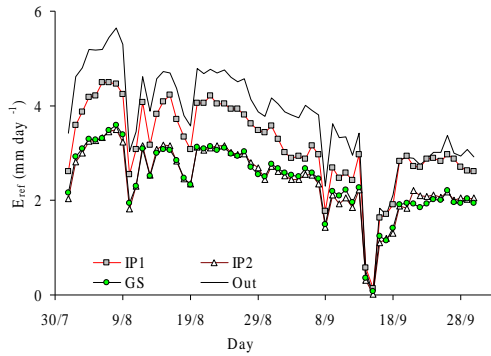
We developed a model based on the hypothesis that the radiative reduction factor ( $\zeta_{rad}$ ) is a function of the screenhouse transmittance, and the advective reduction factor ( $\zeta_{adv}$ ) is a function of the wind ratio.  $E_{ref,in}$  is therefore expressed as:

$$\begin{aligned} E_{ref,in} &= \zeta_{rad} E_{rad,out} + \zeta_{adv} E_{adv,out} \\ &= f(\tau)E_{rad,out} + g(w)E_{adv,out} \quad \dots(3) \end{aligned}$$

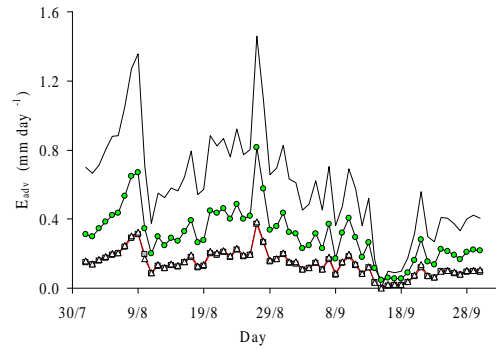
## 3. Results and Discussion

The time evolution of daily reference evapotranspiration (Eq.1) for the open-field and screenhouses (Fig. 1) followed a similar time-pattern to that observed net radiation,  $R_n$ . Compared to  $E_{ref,out}$ , the absolute reduction ( $\Delta E_{ref}$ , mm day<sup>-1</sup>) observed in the screenhouses were -0.60, -1.58 and -1.57 mm day<sup>-1</sup> for IP1, IP2 and SG respectively in Aug, and -0.41, -1.01 and -0.99 mm day<sup>-1</sup> respectively in Sept. Over the two months periods, the mean relative reduction with respect to outside  $E_{ref}$  was 17.4%, 41.3% and 42.6 % in IP1, IP2 and SG respectively.

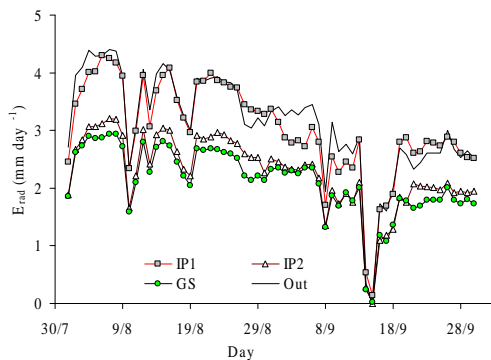
The time pattern of the radiative component,  $E_{rad}$ , (Eq. 2a) followed closely that of  $E_{ref}$ , (Fig. 2). On a monthly scale,  $E_{rad,IP1}$  (3.61 and 2.43 mm day<sup>-1</sup> in Aug. and Sept. respectively) was very close to  $E_{rad,out}$  (3.68 and 2.54 mm day<sup>-1</sup> respectively).  $E_{rad,IP2}$  and  $E_{rad,GS}$  were lower than  $E_{rad,out}$  (2.71 and 2.50 mm day<sup>-1</sup> respectively in Aug, 1.82 and 1.71 mm day<sup>-1</sup> respectively in Sept). Over the whole period of observation, the reduction of  $E_{rad}$  amounted to 3.0%, 27.1% and 31.9 % in IP1, IP2 and SG respectively.



**Figure 1.** Time evolution of reference evapotranspiration ( $E_{ref}$ ) outside and in the three screenhouses. Continuous line = outside; square = IP1; triangle = IP2; circle = GS)



**Figure 3.** Time evolution of the advective component ( $E_{adv}$ ) outside and in the three screenhouses. Symbols as in Fig.1



**Figure 2.** Time evolution of the radiative component ( $E_{rad}$ ) outside and in the three screenhouses. Symbols as in Fig.1

The advective component,  $E_{adv}$  (Eq. 2b) followed a distinct time evolution from  $E_{ref}$  and  $E_{rad}$ , showing maximum and minimum values (Fig. 3) that were concomitant with those of  $D_a$  and  $W_{out}$ .  $E_{adv}$  was the lowest in IP2 and SG, which have the lowest wind ratios ( $\omega = 0.19$  and  $0.20$  respectively), and was approximately doubled for IP1 ( $\omega = 0.43$ ). The latter provided  $E_{adv}$  values that were approximately half of  $E_{adv,out}$ . The mean relative reduction with respect to outside  $E_{adv}$  was 75.1%, 74.0% and 55.8 % in IP1, IP2 and SG respectively.

The respective contribution of the radiative and advective term with respect to  $E_{ref}$  was calculated as the ratio  $\rho_{rad} = E_{rad}/E_{ref}$  and  $\rho_{adv} = E_{adv}/E_{ref} = 1 - \rho_{rad}$ . Over the observation period,  $\rho_{rad}$  was higher in the screenhouses with respect to the outside value, representing on average  $96(\pm 3)$ ,  $94(\pm 4)$  and  $90(\pm 5)$  % for IP1, IP2 and GS respectively, while the mean outside value was  $85(\pm 4)$  %.

Pooling the screenhouse daily data sets for the two-month period ( $n = 183$ ), clear linear relationships were obtained between the parameters  $\zeta_{rad}$  and  $\tau$  on one hand and between  $\zeta_{adv}$  and  $\omega$  on other hand. The regression analysis provided the following relationships are:

$$\zeta_{rad} = 1.90\tau - 0.46 \quad (4a)$$

with  $R^2 = 0.85$  and RMSE (root mean square error) = 0.055, and

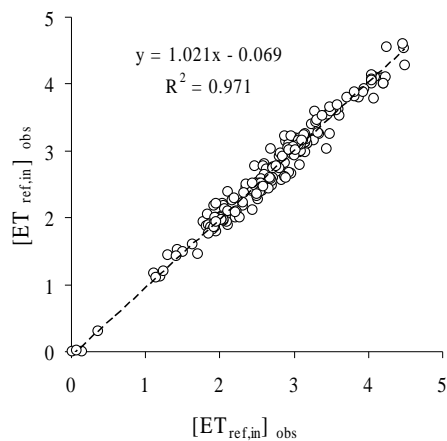
$$\zeta_{adv} = 1.21\omega - 0.00 \quad (4b)$$

with  $R^2 = 0.95$  and RMSE = 0.030.

Using these equations in the model of  $E_{ref,in}$  (Eq. 3), the final model formulation was obtained as:

$$E_{ref,in} = (1.90\tau - 0.46) E_{rad,out} + 1.21 E_{adv,out} \quad (5)$$

The predicted values of  $E_{ref,in}$ , by means of Eq. 5,  $[E_{ref,in}]_{est.}$ , were in fair agreement with the values derived from Eq. 1 using *in situ* measurements of the screenhouse internal variables,  $[E_{ref,in}]_{obs}$  (Fig. 4). The inside reference evapotranspiration was predicted from Eq. 5 with statistical indicators RMSE (root mean square error) =  $0.11 \text{ mm day}^{-1}$ , MBE (mean bias error) =  $-0.02 \text{ mm day}^{-1}$  and  $R^2 = 0.97$ .



**Figure 4.** Relationship between daily observed and estimated values of  $E_{ref,in}$  (in  $mm\ day^{-1}$ ).

From the previous results, it can be deduced that the screenhouses enhanced the predominant role of the radiative component that was observed in open field conditions. The radiative component largely outweighed the advective component in all screenhouses, where  $E_{rad}$  contributed to 96, 94 and 90 % of  $E_{ref}$  in IP1, IP2 and GS respectively, against 85% outside.

This observation underlines that great care should be taken in assessing the radiative component of  $E_{ref}$ , for which small errors in the main driving variable – i.e. solar transmittance (Eq 4a) – could lead to significant errors in  $E_{ref,in}$ . In corollary, the small weight of the advective component indicates that large uncertainties in the determination of the wind ratio would not be critical to the overall model performance (Fig. 4).

#### 4. Conclusion

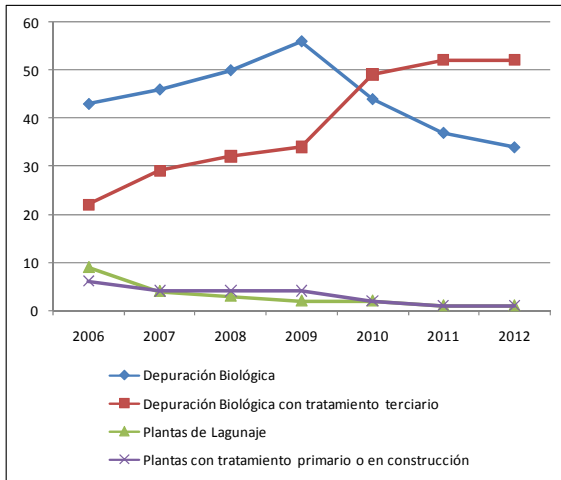
The two main inputs of the model,  $E_{rad,out}$  and  $E_{adv,out}$  can be provided by agricultural extension services without more computation requirements than those corresponding to the calculation of daily  $E_{ref,out}$ . The daily values of the radiative and advective components could therefore be supplied as specific information devoted to screenhouse-crops irrigation scheduling. Individual farmers could easily calculate  $E_{ref,in}$  from the proposed model, provided they have a reliable estimation of the transmittance and wind ratio of their screenhouse. Other option would be that extension services provide farmers with a

synthetic table where  $E_{ref,in}$  is calculated for a range of values of  $\tau$  and  $\omega$ .

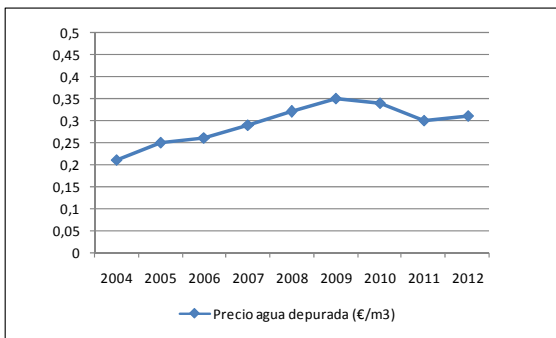
Screenhouse transmittance is a parameter of prime importance in predicting  $E_{ref,in}$ . The main reasons are that (i) the radiative component  $E_{rad}$  is the predominant contributor to total  $E_{ref}$  and (ii) the radiative reduction factor is highly sensitive to  $\tau$ . A reliable estimate of  $\tau$  is therefore required that should be based preferably on *in situ* measurements of the transmittance. This on farm ‘calibration’ could be carried out by research organisms, extension services or manufacturers, for the main cover materials and screenhouse structures that are presently used by farmers.

#### References

- [1] Castellano, S., Scarascia Mugnozza, G., Russo, G., Briassoulis, D., Mistriotis, A., Hemming, S., Waaijenberg, D., 2008. Plastic nets in agriculture: a general review of types and applications. *Appl. Eng. Agric.* 24,799-808.
- [2] Möller, M., Tanny, T., Li, Y., Cohen, S., 2004. Measuring and predicting evapotranspiration in an insect-proof screenhouse. *Agric. For. Meteorol.* 127(1-2), 35-51.
- [3] Möller, M., Assouline, S., 2007. Effects of a shading screen on microclimate and crop water requirements. *Irrig. Sci.* 25(2), 171-181
- [4] Stanhill, G., Cohen, S., 2001. Global dimming: A review of the evidence for a widespread and significant reduction of global radiation with discussion of its probable causes and possible horticultural consequences. *Agric. For. Meteorol.* 107, 255-278
- [5] Allen, R.G., Pereira, L.S., Raes, D., Smith, M., 1998. Crop evapotranspiration – guidelines for computing crop water requirements. *Irrig. Drain. Paper 56*, FAO, Roma, 297 p.
- [6] Tanny, J., Haijun, L., Cohen, S., 2006. Airflow characteristics, energy balance and eddy covariance measurements in a banana screenhouse. *Agric. For. Meteorol.* 139, 105-118
- [7] Siqueira, M., Katul, G., Tanny, J., 2012. The effect of the screen on the mass, momentum, and energy exchange rates of a uniform crop situated in an extensive screenhouse. *Boundary-Layer Meteorol.* 142(3), 339-363



**Figura 1.** Evolución de los métodos de depuración. 2012.



**Figura 2.** Evolución del precio del agua depurada (€/m³). 2012.

SESIÓN I



Tecnología e Ingeniería  
de Alimentos

PÓSTERS

## Modelización y optimización de sistemas de autoenfriamiento de envases alimentarios por adsorción a vacío

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 XII, 48, 30203, Cartagena (Murcia), España.  
esther@telecablemurcia.com

### RESUMEN

El objetivo general de este proyecto es desarrollar un sistema de autoenfriamiento de envases de alimentos líquidos optimizando la tecnología de enfriamiento por adsorción a vacío. Para ello se analizarán, seleccionarán y optimizarán las tecnologías existentes de autoenfriamiento de bebidas envasadas, desde el punto de vista técnico (facilidad de miniaturización y simplicidad, a la vez que efectividad) e higiénico, y de seguridad alimentaria. Se reproducirá el comportamiento termodinámico de cada una de las alternativas posibles, mediante prototipos, utilizando sistemas adecuados de medición, para poder desarrollar un modelo matemático del sistema que contemple por un lado el proceso exotérmico que tiene lugar en el adsorbedor, y por otro el proceso de evaporación. Se analizarán las ventajas e inconvenientes de cada una de las alternativas seleccionadas, para ser aplicadas en envases activos autoenfriantes en bebidas.

**Palabras clave:** adsorbedor; proceso exotérmico; evaporación; modelo matemático.

### 1. Introducción

Mientras que los envases convencionales simplemente actúan como una barrera de protección del alimento, los *envases activos* pueden hacer mucho más. Estos materiales de envasado interactúan con el producto para mejorarlo de alguna manera, o para darle al consumidor mejor información sobre el estado en el que está.

La última propuesta para hacer más activo el envase de cerveza es la lata autoenfriante (*self cooling can*) (Kleiner, 2004). En el sector de la cerveza también se han lanzado al mercado, desde 2000 los barriles metálicos autoenfriantes, (*self chilling keg*), con el sistema *Coolkeg*, cubriendo las capacidades de barriles desde 5 litros a 20 litros, (desarrollado y comercializado por la empresa Cool System Bev., GmbH, de Alemania, [www.coolsystem.com](http://www.coolsystem.com)).

Uno de los problemas de estos envases activos es que son caros, tanto en su desarrollo como en su fabricación. Esta es la razón de que tengan un crecimiento comercial relativamente lento. Pero, esto está cambiando porque las empresas alimentarias en general tratan de poner en el mercado productos más frescos, con mayor calidad gustativa y nutritiva, y con mayor comodidad en su consumo, aunque sean un poco

más caros. Estos alimentos, inicialmente llamados “convenience foods” (alimentos que requieren una mínima preparación para su consumo), vienen denominándose actualmente: “ready to eat foods” o “ready to drink beverages”, según sean alimentos sólidos o líquidos.

El proceso de adsorción de gases y vapores en sólidos adsorbentes como zeolita, sílica gel, carbón activo, etc., ha sido empleado en diferentes campos de la ingeniería de procesos, pero apenas existen aplicaciones en refrigeración debido al uso generalizado de los sistemas de producción de frío por compresión mecánica [1, 2]. Hoy día los sistemas de refrigeración por adsorción constituyen una alternativa real a los sistemas tradicionales de compresión mecánica, ya que utilizan refrigerantes ecológicos, como el agua, y, por otro lado, el ciclo de adsorción puede funcionar con un suministro de calor procedente de energía solar u otras fuentes de energía de bajo coste [2].

Actualmente, para el desarrollo del envase autocalentable o autoenfriante, se utilizan tecnologías basadas en procesos de tipo exotérmico (óxido de calcio con agua), y de tipo endotérmico (enfriamiento evaporativo, adsorbiendo el vapor de agua en un desecante a

vacío), respectivamente. Esta última tecnología se basa en la bien conocida tecnología de producción de frío por adsorción [3], utilizando agua como fluido frigorígeno y zeolita como adsorbente ubicada en un espacio a vacío, pero sin utilizar ningún sistema de regeneración de la zeolita (Guilleminot et al., 1981; Ziegler, 2002; López et al., 2003).

Todas estas tecnologías implican el uso de unos dispositivos relativamente complejos lo que hace que repercutan en el envase un coste excesivamente elevado. Además, los sistemas desarrollados hasta el momento provocan ciertos recelos técnicos y de seguridad alimentaria tanto en las propias industrias de envasado de bebidas y cervezas, como en los propios consumidores.

Por todo lo anterior, en este Proyecto se plantean los siguientes objetivos:

1. Estudiar el sistema actualmente comercializado de enfriamiento por adsorción a vacío, para tratar de disminuir el volumen ocupado por el sistema, y ver las posibilidades de adaptación a nuevos envases tanto metálicos como de plástico.
2. Estudiar las posibilidades de uso de otro sistema de autoenfriamiento rápido del envase, que signifique una alternativa real al sistema anterior por adsorción, para envases hasta de 10 l, tanto metálicos como de plástico.
3. Obtener el diseño óptimo y modelo matemático del sistema de autoenfriamiento más adecuado para envases metálicos, y plásticos de aplicación en refrescos y cerveza.

## 2. Materiales y Métodos

### 1) Estudio de los sistemas actualmente comercializados de autoenfriamiento de bebidas envasadas, que utilizan el sistema de enfriamiento evaporativo y adsorción.

- Revisión bibliográfica con análisis de todas las bases de datos disponibles, incluyendo FSTA, Internet, Bases de patentes, y todas las bases de revistas electrónicas referentes a sistemas de enfriamiento y envasado de alimentos y bebidas.
- Adquisición y análisis en laboratorio de todos los sistemas presentes en el mercado.
- Estudio físico-químico de los componentes del sistema:

a) evaporador: fluidos refrigerantes, materiales de retención de líquido y materiales que forman la pared en el evaporador.

b) adsorbedor: zeolitas y otros materiales desecantes.

Se han realizado análisis con DSC para la identificación de los materiales utilizados en la

fabricación de fibras. Para la determinación de la adsorción y desorción de distintas zeolitas se utilizó un analizador termogravimétrico Shimadzu TGA-50 que mide la variación de masa en un compuesto en función de la temperatura. Para la caracterización dimensional de las fibras se ha utilizado un microscopio de barrido electrónico Hitachi S-3500N.

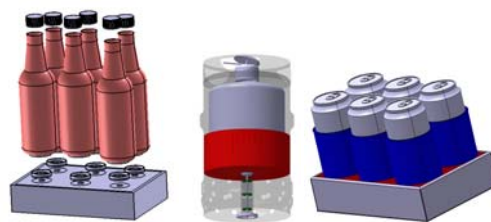
- Estudio termodinámico de cada uno de los dispositivos de autoenfriamiento de bebidas envasadas.
- Estudio de la seguridad alimentaria y del diseño higiénico según las recomendaciones de la EHEDG y la FDA de todos los componentes de los dispositivos de autoenfriamiento de bebidas envasadas presentes en el mercado.
- Estudio de las posibilidades de mejora técnica e higiénica de los sistemas comercializados actualmente.

### 2) Análisis y selección de tecnologías alternativas de autoenfriamiento de bebidas envasadas.

- Estudio y selección de las tecnologías identificadas de producción de frío, en envases activos autoenfriantes para bebidas, en envases metálicos y de plástico, con capacidades de 1, 2, 3, 4, 5 y 10 L. Análisis de las ventajas e inconvenientes de cada una de las alternativas seleccionadas, para ser aplicadas en envases activos autoenfriantes para bebidas, y hasta un volumen de 10 L.

### 3) Estudio de la viabilidad técnica y económica de las tecnologías de producción de frío y elección del sistema más interesante desde el punto de vista técnico y económico.

### 4) Desarrollo del prototipo funcional del sistema de autoenfriamiento de bebidas envasadas, de aplicación a cada uno de los tipos de envase: metálicos (lata y barril de 10 L), y de plástico (de 1/3 y 1, 2, 3, 4, 5 y 10 L).



**Figura 1.** Prototipos autoenfriante para botellas de PET, barril y latas.

## 3. Resultados y Discusión

Se han realizado ensayos experimentales en los diferentes prototipos de latas, botellas y barriles. A continuación se muestra un ensayo experimental llevado a cabo en un sistema



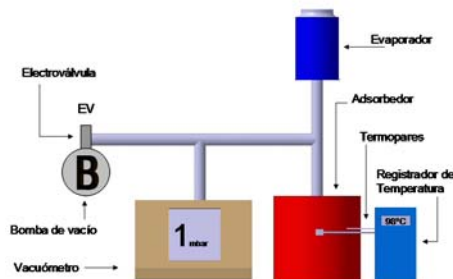
formado por un único lecho en el que se encuentra el evaporador que contiene como refrigerante agua absorbida en un soporte de fibra. El adsorbente es de geometría cilíndrica, de 9 cm de diámetro y 7 cm de altura, encerrado en un envase de acero inoxidable con una pared de 1 mm de espesor. El material adsorbente utilizado es zeolita granulada de 2-3 mm de diámetro. La zeolita utilizada es artificial de la marca Zeo-tech, y tiene una capacidad de adsorción de aproximadamente el 30% de su masa.

Los ensayos experimentales se han realizado trabajando con niveles de vacío en el evaporador/adsorbente comprendidos entre 0.2 y 10 mbar utilizando una bomba de vacío de marca Vacuubrand modelo GZ-6 con un nivel de vacío máximo de  $10^{-4}$  mbar.

En este trabajo se analiza el modelo matemático del proceso de adsorción de vapor de agua, obteniendo las curvas o perfiles de distribución de temperatura en el interior de la masa de zeolita y en la pared metálica del adsorbente, en función de distintos niveles de vacío.

El modelo matemático asume las siguientes hipótesis:

- La temperatura en la cámara del adsorbente se considera uniforme en todos sus puntos.
- La presión se considera uniforme en todo el sistema (evaporador y adsorbente).
- El refrigerante es adsorbido uniformemente en el adsorbente.
- La temperatura de evaporación es la misma que la temperatura del líquido refrigerante en el evaporador.
- La resistencia a la transferencia de calor y de masa en el adsorbente es despreciable.



**Figura 2.** Esquema del equipo utilizado para la realización de los ensayos.

**a) Ecuaciones de adsorción y de equilibrio**

Para calcular el agua adsorbida en el proceso se ha asumido un modelo del tipo LDF (*linear driving*

*force*) ampliamente utilizado en la bibliografía [5].

$$\frac{dx}{dt} = k_1 \cdot (x_{eq} - x) \quad (1)$$

Donde:

- $x$  = Cantidad de agua adsorbida, kg/kg adsorbente.
- $x_{eq}$  = Cantidad de agua adsorbida en el equilibrio, kg/kg adsorbente.
- $T_z$  = Temperatura de la zeolita, K.
- $T_s$  = Temperatura de saturación, K.
- $k_1$  = Constante de cinética de adsorción.

La cantidad de agua adsorbida en el equilibrio se ha calculado a través de la ecuación propuesta por Gorbach *et al*, 2004 [6].

Se ha determinado la constante de cinética de adsorción  $k_1$  utilizando las curvas obtenidas de evolución de la cantidad de agua adsorbida con respecto al tiempo para cada nivel de presión (Fig.3).

b) *Balances de energía en el adsorbente y en la pared del adsorbente.*

- Balance de energía en el material adsorbente:

$$\begin{aligned} [(m_z + x) \cdot (C_z + x \cdot C_a)] \cdot \frac{dT_z}{dt} = -(kF) (T_z - T_m) + \\ \Delta H m_z \cdot \frac{dx}{dt} - ((m_z + x) \cdot T_z \cdot C_a + T_z \cdot (C_z + x \cdot C_a)) \frac{dx}{dt} \end{aligned} \quad (2)$$

Donde:

- $C_z$  = Calor específico zeolita, J/kg K.
- $C_a$  = Calor específico agua, J/kg K.
- $T_m$  = Temperatura pared metálica, K.
- $m_z$  = Masa de zeolita, kg.
- $kF$  = Coeficiente global de transferencia de calor, W/K.
- $\Delta H$  = Entalpía de adsorción del vapor de agua, J/kg.

- Balance de energía en la pared del material adsorbente:

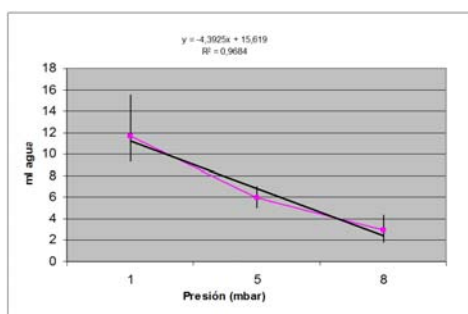
$$m_m C_m \cdot \frac{dT_m}{dt} = (kF) (T_z - T_m) - h_{ext} \cdot (T_m - T_{air}) \quad (3)$$

Donde:

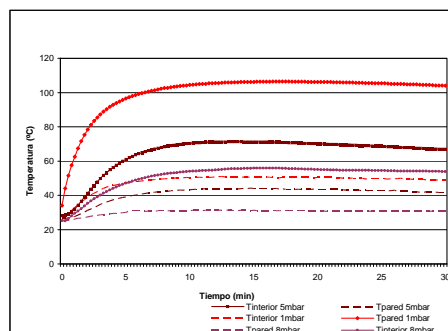
- $C_m$  = Calor específico del metal, J/kg K.
- $m_m$  = Masa del metal, kg.
- $T_{air}$  = Temperatura del aire, K.
- $h_{ext}$  = Coeficiente de transmisión de calor entre zeolita y la pared, W/K.

Las curvas experimentales obtenidas (Fig.4) muestran que la temperatura máxima alcanzada por el material adsorbente aumenta conforme disminuye la presión, alcanzando a la presión de

1 mbar la temperatura máxima obtenida de 106°C. A la presión de 5 mbar la temperatura máxima alcanzada es de 80°C, y a 8 mbar apenas se alcanzan los 55°C. Estas temperaturas máximas obtenidas en el adsorbedor están directamente relacionadas con la rapidez con la que se evapora el agua en el evaporador y se adsorbe en el adsorbedor. Así, la mayor temperatura alcanzada se corresponde con el nivel de presión menor, y con la menor temperatura de evaporación en el evaporador, y con una mayor cantidad de agua evaporada y adsorbida, si se compara con las demás temperaturas alcanzadas a presiones superiores (Fig.5). Se observa que, en una misma cantidad de tiempo, a 1 mbar se adsorbe casi el doble de agua que a 5 mbar, y a 5 mbar se adsorbe también prácticamente el doble que a 8 mbar.



**Figura 3.** Influencia de la presión sobre la cantidad de vapor de agua adsorbida en la zeolita.



**Figura 4.** Evolución de la temperatura interior de la zeolita y de la pared del adsorbedor.

#### 4. Conclusiones

Los sistemas de refrigeración por adsorción constituidos por un solo lecho, pueden ser aplicados a pequeños sistemas de enfriamiento por adsorción en ciclo abierto que no utilizan sistemas forzados de evacuación del calor en el adsorbedor. El modelo matemático que se presenta permite predecir adecuadamente los fenómenos de transferencia de calor que en éste tienen lugar. Se ha establecido un modelo matemático que permite optimizar el diseño de

adsorbedores en función de la presión y de la cantidad de líquido refrigerante adsorbido.

#### 5. Agradecimientos

Son muchas las personas a las que quiero agradecer que me hayan apoyado durante la realización de este trabajo:

Antonio López Gómez y Arturo Esnoz Nicuesa, directores de este trabajo por el apoyo, el ánimo y los consejos brindados.

A mis compañeros del Departamento de Ingeniería de los Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Yulisa, Antonio, Mari Ángeles, Fayiny, y May.

A la empresa Damm, S.A. por su financiación y colaboración en la realización de este trabajo.

#### 6. Referencias bibliográficas

- [1] A. Gorbach, M. Stegmairer and G.Eigenberger.Measurement and Modelling of Water Vapor Adsorption on Zeolite 4A-equilibria and Kinetics. *Adsorption* 10, 29-46, 2004.
- [2] D.C. Wang, Z.Z. Xia, J.Y. Wu. Design and performance prediction of a novel zeolite-water adsorption air conditioner. *Energy Conversion and Management* 47, 590-610, 2006.
- [3] G. Maggio, A. Freni, G. Restuccia. A dynamic model of heat and mass transfer in a double-bed adsorption machine with internal heat recovery. *International Journal of Refrigeration* 29, 589–600, 2006.
- [4] Lu YZ. *Adsorption air-conditioning system with zeolite-water working pair powered by waste heat of fuel gas exhausted from Diesel locomotive.* PhD dissertation. Submitted to Shanghai Jiaotong University 2002.
- [5] Sakada A, Suzuki M. Fundamental study on solar powered adsorption cooling system. *J Chem Eng Jpn* 17, 52-57, 1984.
- [6] Sircar, S. and J.R. Hufton, "Why does The Linear Driving Force Model for Adsorption Kinetics Work". *Adsorption*, 6, 137-147 (2000).

SESIÓN II



Biotecnología  
Agroalimentaria

PÓSTERS

## Genotipado, análisis fenotípico y transcriptómico de accesiones seleccionadas de *Vicia faba*, *Pisum sativum* y *Vigna unguiculata*

M.V. Ruiz-Hernández<sup>(1,2)</sup>, J.Weiss<sup>(2,3)</sup>, C. Egea-Gilabert<sup>(2,3)</sup>, M. Egea-Cortines<sup>(2,3)</sup>, J.A. Fernández<sup>(1,2)</sup>, J. Esteva<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Departamento de Producción Vegetal, Paseo Alfonso XIII, 48, E.T.S. Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, 30203, Cartagena, España. victoria.ruiz@upct.es

<sup>(2)</sup> Instituto de Biotecnología Vegetal. Edificio I+D+i, Plaza del Hospital s/n. Campus Muralla del Mar, Universidad Politécnica de Cartagena, 30202, Cartagena, España

<sup>(3)</sup> Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria, Paseo Alfonso XIII, 48, E.T.S. Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, 30203, Cartagena, España.

### RESUMEN

Las legumbres 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 líneas de mejora con cualidades nutricionales (p.ej. alto contenido en proteínas) y agronómicas (resistencia a estrés abiótico y biótico) óptimas para una producción sostenible y competitiva de proteínas en Europa.

**Palabras clave:** Leguminosas; SNPs; morfología; proteínas; expresión génica

### 1. Introducción

Un tercio de las proteínas consumidas en la dieta humana proceden de las leguminosas [1] y el papel que desempeñan tanto en la dieta humana como en la animal es cada vez más importante. Las legumbres contienen un alto nivel de proteínas y una proporción adecuada de carbohidratos y grasas, entre otros compuestos, que las hacen apropiadas para su uso en una alimentación equilibrada. El valor nutricional de los alimentos depende del genotipo y de las condiciones de crecimiento, por lo que estudios enfocados al conocimiento de las interacciones entre estos dos factores son importantes [2].

Por otro lado, la soja (*Glycine max*) es la leguminosa que tiene la producción más extendida en el mundo (262 Mt/año) y 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.

Las leguminosas son conocidas por sus efectos ambientales beneficiosos, principalmente por las ventajas derivadas de su simbiosis con los rizobios fijadores de nitrógeno ya que, por ejemplo, se puede disminuir 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].

El cultivo histórico de las leguminosas (lentejas, guisante y distintas judías, incluyendo caupí) es muy largo, por lo que se ha generado un amplio rango de genotipos mejorados durante siglos. Las tradiciones nacionales y las condiciones climáticas influyen en el cultivo de legumbres y su consumo, por lo que la importancia de estos cultivos varía ampliamente a lo largo de Europa. En la Unión Europea (UE) hay numerosos bancos de germoplasma en centros de investigación que conservan parte de la diversidad genética, pero existe una cantidad importante de genotipos locales que no están incluidos en estas colecciones y que se conservan de manera particular. Estos genotipos están adaptados a los distintos climas de la UE, por lo que tienen un

gran valor que puede ser aplicado, por ejemplo para la obtención de legumbres resistentes al estrés hídrico producido por el cambio climático.

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, el empleo conjunto de técnicas genómicas y transcriptómicas es necesario.

Actualmente, los grandes avances que ha experimentado la secuenciación y anotación de genomas de leguminosas, junto a los avances técnicos y bioinformáticos, hacen 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, garbanzo (*Cicer arietinum*), Lotus japonicus, lupino (*Lupinus angustifolius*), alfalfa (*Medicago truncatula*) y judía o frijol (*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 UE, se ha aprobado un proyecto llamado “Enhancing of legumes growing in Europe through sustainable cropping for protein supply for food and feed” (EUROLEGUME), dentro del 7º programa marco. 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 protéica. 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 (Fig. 1) seguidos por trabajos en el laboratorio.

### 2.1 Selección de accesiones adaptadas al clima mediterráneo

Mediante el uso de descriptores del “International Board for Plant Genetic Resources” (IBPGR), 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 (erecto, rastrero...), 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 accesiones adaptadas al clima mediterráneo

Dos consorcios han generado dos plataformas que permiten identificar las variaciones en la secuencia de genes de caupí (EEUU) y guisante (Francia), por lo que el genotipado de estas especies se realizará utilizando SNPs conocidos (13.000 en el caso del guisante). Además, debido a que el genoma de *Vicia faba* no está secuenciado, se hará una secuenciación de transcritos con el objetivo de desarrollar e identificar SNPs en esta especie. Para ello, se extraerá ARN, que retrotranscribirá a ADNc y se secuenciará mediante Next Generation Sequencing (IonTorrent™).

### 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 protéico

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.

### 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 (principalmente a escasez de agua) 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.

### 4. Conclusiones

Este proyecto europeo proporcionará herramientas para un aumento de la producción sostenible de guisante, haba y caupí.

### 5. Agradecimientos

Al proyecto EUROLEGUME por financiar este proyecto de tesis doctoral.

### 6. Referencias bibliográficas

[1] P. H. Graham and C. P. Vance. 2003. "Update on Legume Utilization Legumes: Importance and Constraints to Greater Use," vol. 131, no. March, pp. 872–877.

[2] D. Levy. 1986. "Genotypic variation in the response of potatoes (*Solanum tuberosum* L.) to high ambient temperatures and water deficit," *F. Crop. Res.*, vol. 15, no. 1, pp. 85–96, Oct.

[3] "FAOSTAT Gateway." [Online]. Available: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E>. [Accessed: 29-Apr-2014].

[4] T. Nemecek, J.-S. von Richthofen, G. Dubois, P. Casta, R. Charles, and H. Pahl. 2008. "Environmental impacts of introducing grain legumes into European crop rotations," *Eur. J. Agron.*, vol. 28, no. 3, pp. 380–393, Apr.

[5] S. R. Eathington, T. M. Crosbie, M. D. Edwards, R. S. Reiter, and J. K. Bull. 2007. "Molecular Markers in a Commercial Breeding

Program," *Crop Sci.*, vol. 47, no. Supplement\_3, p. S–154, Dec.

[6] P. Gepts, W. D. Beavis, E. C. Brummer, R. C. Shoemaker, H. T. Stalker, N. F. Weeden, and N. D. Young. 2005. "Legumes as a Model Plant Family . Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference 1," vol. 137, no. April, pp. 1228–1235.

[7] "Legume Information System." [Online]. Available: <http://comparative-legumes.org/>. [Accessed: 29-Apr-2014].

### Tablas y Figuras

**Tabla 1.** Accesiones murcianas de caupí para caracterización. CRF-INIA: Centro de Recursos Fitogenéticos del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. RMS: Red Murciana de Semillas.

Nombre accesión	Institución origen	Nombre accesión	Institución origen
BGE022146	CRF-INIA	BGE040819	CRF-INIA
BGE038474	CRF-INIA	BGE044375	CRF-INIA
BGE038477	CRF-INIA	Vi2	RMS
BGE038478	CRF-INIA	Vi 3	RMS
BGE038479	CRF-INIA	Vi4	RMS
BGE039238	CRF-INIA	Vi 10	RMS
BGE040000	CRF-INIA	Vi12	RMS
BGE040818	CRF-INIA	Vi13	RMS



**Figura 1.** A: plantas de caupí en invernadero; B: floración de haba; C: floración en guisante; D: formación de vainas en guisante.

SESIÓN III



Producción Vegetal

PÓSTERS

## Resistencia a insecticidas en *Myzus persicae*: estado actual y mecanismos implicados

A. Belando, I. Moreno, P. Bielza

Departamento de producción vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203, España. ana.belando@upct.es

### RESUMEN

*Myzus persicae* es una plaga que afecta a una amplia gama de cultivos herbáceos, hortícolas y frutales, tanto por sus daños directos como por la capacidad de transmitir más de 100 virus. Su control se basa casi exclusivamente en la aplicación de insecticidas y, como resultado, esta especie ha desarrollado resistencia múltiple a muchas clases químicas, incluyendo organofosforados, carbonatos y piretroides. En el sur de Francia sobre el año 2009 se descubrió sobre melocotoneros un clon de *M. persicae* con resistencia extremadamente potente a los neonicotinoides que compromete la eficacia en campo de este grupo de insecticidas. Dadas las graves consecuencias de esta mutación para un control efectivo de las poblaciones de esta plaga, se realizó un seguimiento de su expansión geográfica. La mutación se ha ido extendiendo, y hasta la fecha se ha encontrado en Italia, Francia y España. Por todo ello es imprescindible conocer bien el estado de la resistencia a insecticidas en las poblaciones de *M. persicae* en los diferentes cultivos en los que causa daños importantes, así como los mecanismos de resistencia implicados, con el fin de diseñar estrategias adecuadas de tratamientos para un uso sostenible de los fitosanitarios. Por tanto se pretende con esta tesis estudiar el desarrollo potencial de la resistencia a los neonicotinoides imidacloprid y tiametoxam, y los insecticidas flonicamid, espirotetramat, pimetrocina y azadiractina.

**Palabras clave:** Flonicamid; spiroetramat; pimetrocina.

### 1. Introducción

El pulgón del melocotonero, *Myzus persicae*, es una plaga de importancia mundial de una amplia gama de cultivos herbáceos, hortícolas y frutales, por sus daños directos y por su capacidad de transmitir más de 100 virus de las plantas [1]. Excepto en cultivos hortícolas en invernaderos, su control se basa casi exclusivamente en la aplicación de insecticidas y, como resultado, esta especie ha desarrollado resistencia múltiple a muchas clases químicas, incluyendo organofosforados, carbamatos y piretroides [2]. Los mecanismos moleculares de la resistencia a los insecticidas en *M. persicae* incluyen la sobreproducción de carboxilesterasas de desintoxicación (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 de voltaje (resistencia *knockdown*, *kdr*) dando resistencia a los piretroides [2]. Los neonicotinoides tales como imidacloprid, tiametoxam, clotianidina y acetamiprid no se ven afectados por estos mecanismos, y son actualmente el principal medio de control. A pesar de dos décadas de constante aumento del uso, los neonicotinoides han demostrado ser notablemente resistentes al desarrollo de la resistencia y se han mantenido muy eficaces contra *M. persicae*. Se han encontrado poblaciones de *M. persicae* con susceptibilidad reducida a compuestos neonicotinoides (10-40 veces la resistencia) en Europa, los EE.UU. y Japón [3-5]. Sin embargo, en la actualidad los niveles de resistencia descritos tienen un significado práctico limitado, ya que son insuficientes para poner en peligro la eficacia en campo de estos insecticidas [3,5].

Recientemente, se han utilizado enfoques bioquímicos y genómicos para investigar la



resistencia a los neonicotinoides en un clon de *M. persicae* de Grecia mostrando un factor de resistencia a los neonicotinoides de ~40 [6,7]. La resistencia se asocia con múltiples duplicaciones de un solo gen P450 (CYP6CY3), con pulgones resistentes que llevan ~18 copias del gen en comparación con las dos copias se encuentran en los pulgones susceptibles. Sin embargo, los estudios de unión a ligando y de secuenciación no aportaron pruebas de que la modificación estructural del receptor de nicotínico de la acetilcolina (nAChR; el punto de acción de los neonicotinoides) contribuyera a la resistencia en este clon. Aunque los pulgones han seguido siendo efectivamente controlados por los neonicotinoides, la resistencia es un problema significativo en otras especies de insectos plaga, incluyendo *Leptinotarsa decemlineata*, *Nilaparvata lugens* y *Bemisia tabaci* [5]. Como el encontrado en *M. persicae*, la sobreexpresión de uno o más P450s parece ser el principal mecanismo de resistencia a neonicotinoides en plagas de insectos [5,8]. El único mecanismo alternativo descrito hasta la fecha, ha sido una modificación del punto de acción (nAChR) en una población seleccionada en laboratorio *N. lugens*, en el que la resistencia se asoció con una mutación puntual en dos subunidades alfa de nAChR (N1 $\alpha$ 1 y N1 $\alpha$ 3) [9]. Sin embargo, la resistencia en poblaciones de campo de *N. lugens* parece ocurrir exclusivamente a través de la desintoxicación mediada por P450 [10,11] y, hasta recientemente, ningún caso de insensibilidad en el punto de acción de los neonicotinoides se ha descrito en individuos de cualquier plaga de insectos recogidos directamente en el campo.

En 2009, se descubrió sobre melocotoneros en el sur de Francia un clon de *M. persicae* con resistencia extremadamente potente a los neonicotinoides que compromete la eficacia en campo de los miembros de esta clase de insecticidas [12]. La resistencia es conferida tanto por la desintoxicación mediada por P450s y por la insensibilidad del punto de acción de los neonicotinoides. Este es el primer ejemplo de la resistencia a los neonicotinoides en el punto de acción encontrada en poblaciones de campo. La comparación de la secuencia de nucleótidos de seis genes de subunidades del nAChR (M $\alpha$ 1-5 y M $\beta$ 1) de clones de pulgones resistentes y susceptibles, reveló un único punto de mutación en la región D del bucle de la subunidad  $\beta$ 1 del nAChR del clon resistente, causando una sustitución de arginina a treonina (R81T) [12].

Dadas las graves consecuencias de esta mutación para un control efectivo de las poblaciones de esta plaga, se realizó un seguimiento de su expansión geográfica. La mutación se ha ido extendiendo, y hasta la fecha se ha encontrado en Italia, Francia y España [13]. Dentro de España, se ha encontrado en plantaciones de frutales de hueso de Cataluña, Aragón, Murcia y Extremadura.

La gravedad de la situación ha motivado que se haya desarrollado una estrategia de manejo de la resistencia en pulgones de los frutales de hueso, limitando el uso de neonicotinoides a una sola aplicación por campaña, y así reducir al máximo la presión de selección sobre esta nueva mutación y, por tanto, impedir su diseminación.

Además, la limitación del uso de neonicotinoides ha llevado a un mayor uso, y a veces sobreuso y abuso, de otros insecticidas como el flonicamid, espirotetramat, pimetrocina y azadiractin. Debido a este sobreuso ya se han observado algunos casos de fallos de control en campo con alguno de estos productos.

Por otra parte, existe una profunda preocupación de que esta mutación que confiere resistencia extrema a los neonicotinoides se pase a las poblaciones de hortícolas, lo que agravaría enormemente el problema.

En España no se ha realizado nunca un estudio del estado de la resistencia a insecticidas en una plaga agrícola tan importante como *M. persicae*. Obviamente tampoco se conoce la prevalencia en las poblaciones españolas de los mecanismos de resistencia conocidos (a carbamatos, fosforados y piretroides) ni de los nuevos (a neonicotinoides), ni si pudieran presentarse algunos nuevos.

Para diseñar una estrategia eficaz de manejo de la resistencia, como demanda la Directiva Europea de Uso Sostenible de Fitosanitarios, es necesario conocer bien qué insecticidas se pueden rotar al no tener resistencia cruzadas, es decir, al no estar afectados por el mismo mecanismo de resistencia. Por tanto, no basta rotar insecticidas con distinto modo de acción (pertenecientes a distintos grupos químicos), ya que los mecanismos metabólicos de detoxificación pueden afectar a compuestos de distintas familias químicas, con distintos modos de acción [14]. Consecuentemente, es necesario conocer los mecanismos implicados en la resistencia a cada insecticida, para a partir de esa base científica, diseñar estrategias de control efectivas y sostenibles en el tiempo.

Por todo ello es imprescindible conocer bien el estado de la resistencia a insecticidas en las poblaciones de *M. persicae* en los diferentes cultivos en los que causa daños importantes, así como los mecanismos de resistencia implicados, con el fin de diseñar estrategias adecuadas de tratamientos para un uso sostenible de los fitosanitarios. Por tanto en este trabajo de tesis se pretende estudiar el desarrollo potencial de la resistencia a los neonicotinoides imidacloprid y tiametoxam, y los insecticidas flonicamid, espirotetramat, pimetrocina y azadiractina, en poblaciones de *M. persicae* de cultivos frutales y hortícolas de la Región de Murcia y otras regiones españolas.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Poblaciones

Se recogerán 10-15 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 criarán sobre plantas de pimiento en jaulas.

### 2.2 Insecticidas

Se utilizarán flonicamid, spirotetramat, imidacloprid, tiametoxam, pimetrozina y azadiractina.

### 2.3 Bioensayos

Para los ensayos completos se utilizan 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 tomarán para un rango de 0 – 100 % de mortalidad.

En hojas de pimiento se realizaran discos (37 mm diámetro) que serán sumergidos durante 10 segundos en la solución acuosa del insecticida a ensayar. Los discos son secados al aire y puestos sobre agar (2%) con el envés hacia arriba en la base de cajas de polipropileno (Fig.1). Las cajas son tapadas con su tapa, en la que se han efectuado agujeros de ventilación y otro mayor para introducir los pulgones. Las placas son mantenidas a 25 °C y fotoperíodo de 16:8 h (luz:oscuridad). La mortalidad se estimará a las 24, 48 y 72 horas para ajustar el mejor periodo para cada insecticida. Se realizarán los bioensayos con ninfas de 3-4 días (spirotetramat) y adultos ápteros (resto insecticidas).

### 2.4 Bioensayos de sinergistas

Este tipo de bioensayos se realizan para poder determinar que posibles mecanismos están implicados en la resistencia a insecticidas. Se basan en añadir un producto que por sí sólo no tiene efecto plaguicida, pero sin embargo cuando se le añade a los insecticidas, éstos incrementan su actividad. Los sinergistas utilizados en este estudio serán el butóxido de piperonilo (PBO) y el S,S,S tributil fosforotritioato (DEF). El PBO es un inhibidor del citocromo P450 y el DEF inhibe las esterasas.

La metodología de estos bioensayos es similar a los descritos anteriormente. Se diferencian en que dos horas antes de ser tratadas las hojas con el insecticida se realiza un tratamiento con el sinergista. Todas las hojas son tratadas con una única dosis subletal y se deja un control para asegurarnos que realmente el sinergista por sí sólo no tiene efecto sobre *M. persicae*. El resto del bioensayo sigue los pasos de un bioensayo normal.

## 3. Resultados

Se espera obtener una estimación del estado de la resistencia a los principales insecticidas utilizados para el control de *M. persicae*. Esto junto con la información suministrada por los mecanismos de resistencia implicados, nos ayudará a entender las resistencias cruzadas y, por tanto, diseñar estrategias eficaces de manejo de la resistencia.

## 4. Agradecimientos

Este trabajo está siendo financiado por IRAC España.

## 5. Referencias bibliográficas

- [1] Blackman RL, Eastop VF: Aphids on the world's crops, an identification and information guide. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd; 2000.
- [2]. Devonshire AL, Field LM, Foster SP, Moores GD, Williamson MS, Blackman RL: The evolution of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1998, 353:1677-1684.
- [3]. Foster SP, Cox D, Oliphant L, Mitchinson S, Denholm I: Correlated responses to neonicotinoid insecticides in clones of the peach-

potato aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Pest Manag Sci* 2008, 64:1111-1114

[4]. Margaritopoulos JT, Skouras PJ, Nikolaidou P, Manolikaki J, Maritsa K, Tsamandani K, Kanavaki OM, Bacandritsos N, Zarpas KD, Tsitsipis JA: Insecticide resistance status of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) populations from peach and tobacco in mainland Greece. *Pest Manag Sci* 2007, 63:821-829.

[5]. Nauen R, Denholm I: Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: Current status and future prospects. *Arch Insect Biochem Physiol* 2005, 58:200-215.

6. Philippou D, Field LM, Moores GD: Metabolic enzyme(s) confer imidacloprid resistance in a clone of *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) from Greece. *Pest Manag Sci* 2009, 66:390-395.

[7]. Puinean AM, Foster SP, Oliphant L, Denholm I, Field LM, Millar NS, Williamson MS, Bass C: Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *PLoS Genet* 2010, 6:e1000999.

[8]. Karunker I, Benting J, Lueke B, Ponge T, Nauen R, Roditakis E, Vontas J, Gorman K, Denholm I, Morin S: Over-expression of cytochrome P450 CYP6CM1 is associated with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Insect Biochem Mol Biol* 2008, 38:634-644.

[9]. Liu ZW, Williamson MS, Lansdell SJ, Denholm I, Han ZJ, Millar NS: A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper). *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102:8420-8425.

[10]. Puinean AM, Denholm I, Millar NS, Nauen R, Williamson MS: Characterisation of imidacloprid resistance mechanisms in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål (Hemiptera: Delphacidae). *Pest Biochem Physiol* 2010, 97:129-132.

[11]. Wen Y, Liu Z, Bao H, Han Z: Imidacloprid resistance and its mechanisms in field populations of brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål in China. *Pest Biochem Physiol* 2009, 94:36-42.

[12] Bass, C., Puinean, A. M., Andrews, M., Cutler, P., Daniels, M., Elias, J., ... & Slater, R. (2011). Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor  $\beta$  subunit is associated with resistance to

neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *BMC neuroscience*, 12(1), 51.

[13] 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 management science*, 68(4), 634-638.

[14] Bielza, P. (2008). Insecticide resistance management strategies against the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Pest management science*, 64(11), 1131-1138.



**Figura 1.** Bioensayo

## Mecanismos de resistencia a insecticidas en *Bemisia tabaci* (Gennadius) y costes ecológicos asociados a la resistencia

I. Moreno, A. Belando, P. Bielza

Departamento de Producción Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena, España.  
inma.moreno@upct.es

### RESUMEN

La gran capacidad de *Bemisia tabaci* (Gennadius) para desarrollar resistencias frente a numerosos insecticidas así como resistencias cruzadas ha hecho necesario la búsqueda de alternativas para crear estrategias de control eficaces. Puesto que ya se conoce el estado actual de los niveles de resistencia en *B. tabaci* a diferentes insecticidas (alfa-cipermetrín, azadiractín, buprofecín, pimetozina, piridabén y piriproxifén), ahora es necesario lograr avances no sólo en su modo de acción si no en los mecanismos de resistencia en dicha plaga. Por tanto, para comprobar si la resistencia a insecticidas viene dada por los mecanismos enzimáticos de detoxificación, se van a realizar bioensayos de sinergistas (PBO (butóxido de piperonilo) inhibe específicamente P-450 monooxigenasas, DEF (S,S,S,-tributilfosforotritonato) inhibe esterasas y DEM (dietil maleato) inhibe glutatión-S-transferasas (GSTs)) comparativos, utilizando una población sensible de referencia (KO) y poblaciones resistentes a, pimetozina (KOPIME), azadiractín (KOAZA), buprofecín (KOBU), alfa-cipermetrín (KOALFA), piriproxifén (KOPIX) y piridabén (KOPIB). Además, para predecir el desarrollo de poblaciones resistentes es importante conocer si existen costes ecológicos de la resistencia, ya que la adquisición de los mecanismos de resistencia puede tener un efecto negativo en la valencia ecológica de la población resistente. Para ello, se va a medir y comparar, la fecundidad, fertilidad, longevidad u otros parámetros biológicos de interés, tanto en la población sensible como las resistentes nombradas anteriormente.

**Palabras clave:** Pimetozina; azadiractín; alfa-cipermetrín; piriproxifén; piridabén.

### 1. Introducción

Como consecuencia de la exposición extensa a los insecticidas, *Bemisia tabaci* (Gennadius) ha desarrollado resistencia a una amplia gama de agentes de control químico. La necesidad de una mayor diversidad de productos químicos para el control de mosca blanca en los programas de manejo de la resistencia ha dado lugar a la introducción de varios insecticidas con nuevos modos de acción, que no se ven afectadas por los mecanismos de resistencia a los organofosforados, por ejemplo, o piretroides.

La resistencia a imidacloprid se demostró por primera vez en *B. tabaci* en invernaderos en la región de Almería en el sur de España, pero también fue detectado en poblaciones de Italia y Alemania [1,2] y en Arizona, pero a niveles más bajos [3].

En el caso de los insecticidas reguladores del crecimiento, a pesar de tener un modo de acción único, han demostrado estar sujetos también a la resistencia por *B. tabaci*. Los cambios en la susceptibilidad a buprofecín y piriproxifén han

sido bien documentados y, de forma similar a imidacloprid, se detectaron por primera vez en sistemas de producción intensiva, cerrados. La resistencia a buprofecín fue documentada por primera vez en poblaciones de *B. tabaci* recogidas en invernaderos de los Países Bajos, y en invernaderos de España e Israel [4,5], donde los cambios en la susceptibilidad se asociaron con aplicaciones repetidas del compuesto.

Piriproxifén se utilizó por primera vez en Israel en 1991, y al cabo de un año, se detectó un nivel relativamente alto de resistencia (> 500 veces) en poblaciones de *B. tabaci* recolectadas de un invernadero de rosas, donde las poblaciones habían sido expuestas a tres aplicaciones consecutivas [5].

En el 2005, ya aparece publicado resistencias a alfa-cipermetrín en poblaciones recogidas en cultivos de berenjena en Grecia [6].

En carbamatos como metomilo, ya en los años 90 se observaron resistencia en poblaciones en Pakistán [7].

En poblaciones recogidas en invernaderos de Almería en 1994 se observaron resistencias a pimetozina, a pesar que nunca se había usado [1].

Actualmente, se pueden encontrar en la literatura casos en los que *B. tabaci* ha presentado resistencias a más de 45 materias activas distintas, por esto es necesario implementar programas de control integrado y de manejo de la resistencia en *B. tabaci* utilizando distintos sistemas de control e insecticidas con diferentes mecanismos de acción que permitan su sostenibilidad en el tiempo.

A pesar de los numerosos trabajos que existen sobre la resistencia a insecticidas en *B. tabaci*, no se conocen bien los mecanismos implicados, por lo que es difícil prever las potenciales resistencias cruzadas. Sin esa información, no se puede diseñar un efectivo programa de manejo de la resistencia, que ayude a mitigar la evolución de poblaciones resistentes.

Además, para predecir el desarrollo de poblaciones resistentes es importante conocer si existen costes ecológicos de la resistencia. La adquisición de los mecanismos de resistencia puede tener un efecto negativo en la valencia ecológica de la población resistente. Es decir, los individuos resistentes se reproducen menos al tener una fecundidad menor, o fertilidad, o longevidad, etc.

Los objetivos de esta tesis son conocer los mecanismos de resistencia en *B. tabaci* y si existen costes asociados a la resistencia.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Poblaciones

Se utilizarán la población susceptible de referencia de nuestro laboratorio y las poblaciones resistentes seleccionadas a cada insecticida (Tabla 1).

### 2.2 Insecticidas

Se utilizarán pimetozina, azadiractina, buprofecín, alfa-cipermetrín, piriproxifén, y piridabén.

### 2.3 Bioensayos

Se utilizan plántulas de algodón de unos 20 ó 25 cm de altura, con unas 4 hojas verdaderas. A una de las hojas más jóvenes se le fija una caja-pinza

sujeta mediante un palito de madera, con unas 40 hembras adultas en su interior, de manera que los individuos queden en el envés de la hoja y se mantiene durante 48 horas (Fig. 1).

Transcurrido este periodo de tiempo, se procede al desmontaje del ensayo, se quita la caja-pinza y se aspira la mosca. A cada planta se le asigna un número y se introduce en una jaula de malla como las que se utilizan para la cría, que se mantendrá en el laboratorio durante 12 días.

Transcurrido este tiempo, suficiente para alcanzar el estadio N2, se observa cada planta en la lupa binocular, y con un rotulador permanente se van marcando una por una las ninfas N2 hasta llegar a un máximo de 30 (Fig. 2).

Una vez marcadas las 21 plantas que se utilizan para cada bioensayo (6 dosis más un control y 3 repeticiones para cada una), se reparten por dosis, de manera que el número de ninfas en cada repetición sea lo más homogéneo posible (sólo en los casos en los que no se alcanzan los 30 ninfas/hoja)

Se separan las plantas que se tratan con cada dosis, se preparan las 6 dosis necesarias y el control, todas ellas con agua destilada y mojante, y se procede al tratamiento (Fig. 3). Éste se lleva a cabo introduciendo por completo la hoja con las ninfas durante 10 segundos en la dosis correspondiente. Al sacarla se deja que gotee el exceso de líquido y se dejan secar al aire entre 30 y 60 minutos.

Transcurrido ese periodo de tiempo, una vez que las plantas están secas, se introducen en la jaula en la que estaban antes de tratamiento, y se mantienen de nuevo en el laboratorio hasta el momento del conteo de la mortalidad, día 30 desde que se inició el bioensayo. Se ha fijado este periodo de tiempo, porque en estudios previos se ha visto que en las condiciones de nuestro laboratorio es el tiempo necesario para que todos los huevos lleguen al menos a estado de pupa. Por ello, en el conteo, se consideran como individuos vivos aquellos que se han desarrollado hasta llegar a estado de pupa, y también los exuvios (el adulto ya ha emergido). Por otro lado, se consideran muertos los huevos no eclosionados, y tanto las ninfas muertas como aquellas ninfas que a pesar de tener buen aspecto aún no han llegado a estado de pupa (Fig. 4).

### 2.4 Bioensayos de sinergistas

Este tipo de bioensayos se realizan para poder determinar que posibles mecanismos están

implicados en la resistencia a insecticidas. Se basan en añadir un producto que por sí sólo no tiene efecto plaguicida, pero sin embargo cuando se le añade a los insecticidas, éstos incrementan su actividad. Los sinergistas utilizados en este estudio serán el butóxido de piperonilo (PBO), el S,S,S tributil fosforotrioato (DEF) y el dietil maleato (DEM). El PBO es un inhibidor del citocromo P450, el DEF inhibe las esterasas y el DEM inhibe glutatión-S-transferasas (GSTs).

La metodología de estos bioensayos es similar a los descritos anteriormente. Se diferencian en que dos horas antes de ser tratadas las plantas con el insecticida se realiza un tratamiento con el sinergista. Todas las plantas son tratadas con una única dosis subletal y se deja un control para asegurarnos que realmente el sinergista por sí sólo no tiene efecto sobre *B. tabaci*. El resto del bioensayo sigue los pasos de un bioensayo normal.

### 2.5 Fecundidad y fertilidad

Se utilizan plántulas de algodón de unos 20 ó 25 cm de altura, con unas 4 hojas verdaderas. A una de las hojas más jóvenes se le fija una caja-pinza sujeta mediante un palito de madera, con unas 30 hembras adultas en su interior, de manera que los individuos queden en el envés de la hoja y se mantiene durante 48 horas (Fig. 1).

Transcurrido este periodo de tiempo, se procede al desmontaje del ensayo, se quita la caja-pinza y se aspira la mosca y se cuentan. En cada planta se cuentan los huevos depositados, obteniendo la fecundidad media por hembra. Las hojas se vuelven a leer a los 8 días para estimar el porcentaje de huevos eclosionados (fertilidad).

### 3. Resultados

Se espera llegar a conocer los mecanismos implicados en la resistencia a insecticidas en *B. tabaci* y el coste ecológico que conllevan. Todo ello nos ayudará a diseñar estrategias eficaces de manejo de la resistencia.

### 4. Agradecimientos

Agradecer la financiación del Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2011-25164) y los fondos europeos FEDER.

### 5. Referencias bibliográficas

[1] Elbert A., Nauen R., 2000. Resistance of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) to

insecticides in southern Spain with special reference to neonicotinoids. *Pest Manage. Sci.* 56: 60-64.

[2] Nauen, R.; Stump, N. and Elbert, A. 2002. Toxicological and mechanistic studies on neonicotinoid cross resistance in Q-type *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Pest Management Science.* 58: 868-875.

[3] Li, A.Y., Dennehy, T.J., Li, S., Wigert, M.E., Zaborac, M., Nichols, R.L., 2001. Sustaining Arizona's fragile success in whitefly resistance management, In: Dugger, P. and Richter, D. (Eds.), *Proceedings Beltwide Cotton Conferences.* National Cotton Council, Memphis, TN, pp. 1108-1114.

[4] Cahill, M., Jarvis, W., Gorman, K., Denholm, I., 1996. Resolution of baseline responses and documentation of resistance to buprofezin in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Bull. Entomol. Res.* 86: 117-122.

[5] Horowitz, A.R., Ishaaya, I., 1994. Managing resistance to insect growth regulators in the sweetpotato whitefly (Homoptera: aleyrodidae). *J. Econ. Entomol.* 87: 866-871.

[6] Roditakis, E., Roditakis, N.E., Tsagkarakou, A. 2005. Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) populations from Crete. *Pest Management Science.* 61: 577-582.

[7] Ahmad, M., Arif, M., Naveed M. 2010. Dynamics of Resistance to organophosphate and carbamate insecticides in the cotton whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) from Pakistan. *Journal of pesticide science.* 83: 409-420.

### Tablas y Figuras

Tabla 1. Poblaciones

Población	Resistente a
KO	Susceptible
KOPIME	Pimetrozina
KOAZA	Azadiractín
KOBU	Buprofezín
KOPIX	Piriproxifén
KOPIB	Piridabén
KOALFA	Alfa-cipermetrín



**Figura 1.** Cajas-pinza en plántulas de algodón



**Figura 2.** Marcado de ninfas en hojas de algodón



**Figura 3.** Tratamiento



**Figura 4.** Pupa viva y ninfa muerta de *B. tabaci*

# Factores de susceptibilidad al Virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*, PepMV): Identificación, caracterización de su papel en la biología del virus y uso como dianas de mejora de resistencias

F. Ruiz-Ramón, M. Aranda

Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS), Departamento de Biología del Estrés y Patología Vegetal, apdo. correos 164, 30100 Espinardo, Murcia, España. fruiz@cebas.csic.es

## RESUMEN

El virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*, PepMV) se ha convertido en un factor limitante para la producción y calidad del tomate en la Región de Murcia. Aunque se ha descrito la existencia de algunas posibles fuentes donadoras de resistencia a PepMV, éstas parecen parciales, controladas por genéticas complejas y específicas de cepa viral. Por lo tanto, se hace necesario abordar estrategias alternativas para el desarrollo de variedades de tomate resistentes a PepMV. Esta es la finalidad de este trabajo, cuyo fundamento es el siguiente: Los virus son parásitos obligados que necesitan de la maquinaria celular del huésped para su multiplicación. La mutación o pérdida de los factores del huésped que son requeridos por los virus para completar sus ciclos (factores de susceptibilidad) puede dar lugar a alelos recesivos que confieran resistencia a virus. Así pues, el presente trabajo, que parte de resultados obtenidos por el grupo de Patología Vegetal del CEBAS-CSIC, pretende identificar las proteínas de tomate que interaccionan con las proteínas de PepMV (i.e., caracterizar el interactoma de PepMV) con el objetivo de identificar factores de susceptibilidad al virus para su posible uso como dianas de mejora de resistencias.

**Palabras clave:** Interactoma, silenciamiento, VIGS, resistencia, tomate.

## 1. Introducción

El virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*, PepMV) se ha convertido en un factor limitante para la producción y calidad del tomate en la Región de Murcia. Aunque se ha descrito la existencia de algunas posibles fuentes donadoras de resistencia a PepMV, éstas parecen parciales, controladas por genéticas complejas y específicas de cepa viral. Por lo que se hace necesario buscar estrategias alternativas para la creación de variedades resistentes a PepMV.

El virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) se detectó por primera vez en el año 1974 en Perú en plantas de pepino dulce (*Solanum muricatum* Aiton) infectadas. En 1999, se detectó por primera vez en planta de tomate en cultivo bajo invernadero en Holanda [1]. En la actualidad se ha detectado PepMV en varios países de América del Norte y del Sur, Europa, África y Asia. En España la mayor incidencia de la enfermedad se da en las provincias de Murcia, Almería y en el

archipiélago canario [2,3]. En algunas de estas comunidades autónomas, como la Región de Murcia, las pérdidas alcanzaron hasta el 40% de la producción en parcelas afectadas en el año 2000 [4]. Los síntomas causados por este virus son muy variables dependiendo de la variedad de tomate afectado, el estado fenológico de la planta, las condiciones ambientales (luz y temperatura) y el aislado de PepMV que infecte la planta. Los principales síntomas comprenden mosaicos verdes, amarillos y brillantes, abullonados, filimorfismos, estriaduras verdes en tallo. En fruto maduro puede presentar mosaicos o maduración irregular además de afectar al rendimiento de la planta. Estos daños se ven atenuados a temperaturas superiores a 25°C [4]. Por el momento, no se han identificado vectores específicos para este virus, pero su eficiente transmisión mecánica y la alta estabilidad de su partícula viral pueden estar facilitando notablemente su rápida extensión [5].



A nivel molecular el genoma de PepMV está compuesto por una cadena de RNA de sentido positivo con un tamaño de 6,4 kb [6] que contiene 5 ORFs. El ORF más próximo al extremo 5' codifica la replicasa viral, una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) (163-164 kDa). Los ORFs 2, 3 y 4 se solapan parcialmente en diferentes marcos de lectura, poseen la organización típica del bloque triple de genes de potexvirus (*triple gene block*, TGB), y codifican péptidos de 26, 14 y 9 kDa, respectivamente. El ORF más cercano al extremo 3' codifica la proteína de la cápsida (CP), con un tamaño de 25 kDa. La estrategia de expresión de los ORFs codificados por el genoma de PepMV presumiblemente sea la misma que la de otros potexvirus, de forma que el gRNA actuaría como mensajero para la expresión de la replicasa viral mientras que los ORFs próximos al extremo 3' se expresarían a través de RNAs mensajeros subgenómicos (sgRNAs).

Los métodos de control de las enfermedades inducidas por PepMV incluyen esencialmente la destrucción de plantas infectadas y la prevención de la transmisión del virus mediante medidas higiénicas durante el cultivo y la propagación de material vegetal. Sería muy deseable poder contar con variedades comerciales de tomate resistentes a PepMV, pero de momento no existe en el mercado ninguna de estas variedades. Sí se ha descrito la existencia de algunas posibles fuentes donadoras de resistencia, como por ejemplo la entrada LA 1708 de *Solanum peruvianum*. Sin embargo, las fuentes de resistencia a PepMV descritas por el momento parecen consistir en resistencias parciales, controladas por genéticas complejas y a menudo, específicas de cepa viral [7]. Es por tanto conveniente y oportuno abordar estrategias alternativas para la identificación de nuevas fuentes de resistencia a PepMV. En este trabajo se plantea la identificación de las proteínas de tomate que interactúan con las proteínas de PepMV (i.e., caracterizar el interactoma de PepMV) con el objetivo de identificar factores de susceptibilidad al virus para su posible uso como dianas de mejora de resistencias. Así pues, la hipótesis de partida de este trabajo consiste en que al menos una parte de las proteínas de tomate que interactúen con las proteínas de PepMV sean probablemente utilizadas por el virus en alguna fase de su ciclo; la modificación o ausencia de alguna de estas proteínas puede tener como consecuencia la ausencia de multiplicación del virus. Estas proteínas del huésped, denominadas factores de

susceptibilidad, constituyen dianas para la mejora biotecnológica de resistencias. Es importante destacar que existen técnicas descritas de forma relativamente reciente (ej. TILLING) que hacen que esta mejora biotecnológica no deba pasar necesariamente por la obtención y uso de plantas transgénicas. Por tanto este trabajo se basa en la generación de mutantes de predad de susceptibilidad mediante la identificación de proteínas del huésped que interactúan con proteínas codificadas por el genoma viral. Hasta el momento se han identificado 26 interactores y 9 parálogos con la técnica de Yeast two-hybrid y con la finalidad de identificar entre estos interactores aquellos factores cuyo silenciamiento esté asociado con la pérdida de susceptibilidad a PepMV se va a emplear la técnica de VIGS.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Material vegetal

El material vegetal empleado van a ser como planta modelo *Nicotiana Benthamina* y posteriormente se reproducirán los resultados en tomate var. "Moneymaker".

### 2.2 Métodos

La principal técnica a emplear en este trabajo es el silenciamiento de genes inducido por virus (VIGS). VIGS es un método relativamente rápido de silenciamiento de genes de planta que permite la descripción de su función. La popularidad de este método puede ser atribuida a cuatro razones. La primera de ellas es que es un sistema simple que se basa en la agroinfiltración de las plantas. En segundo lugar, los resultados se obtienen de forma rápida de dos a tres semanas de la post-inoculación. En tercer lugar, la tecnología no pasa por etapas de transformación y por lo tanto es aplicable al número de especies de plantas y por último es un método con gran potencial ya que permite silenciar genes multicopia.

VIGS se basa en el ARN de interferencia (ARNi), que se basa a el silenciamiento de la expresión génica mediada por un pequeño fragmento de ARN específico.

## 3. Resultados y Discusión

Los resultados esperados se basan en la identificación entre los interactores de la TGBp1, aquellos factores cuyo silenciamiento esté

asociado con la pérdida de susceptibilidad a PepMV, así como caracterizarlos y estudiar sus mecanismos de interacción.

#### **4. Agradecimientos**

A la Fundación Seneca por financiar esta tesis doctoral.

#### **5. Referencias bibliográficas**

- [1] Van der Vlugt *et al.*, 2000. Report of pepino mosaic virus en tomato. *Plant disease*, 84 (1), 103
- [2] Pagán, I. *et al.*, 2006 Genetic structure of the population of Pepino mosaic virus infecting tomato crops in Spain. *Phytopathology* 96:274–279.
- [3] Soler-Aleixandre, S. *et al.*, 2007. Sources of resistance to *Pepino mosaic virus* (PepMV) in tomato. *HortScience*, 42, 40–45.
- [4] Soler, S. *et al.*, 2000. El Pepino Mosaic Virus (PepMV), una nueva amenaza para el cultivo del tomate II. *Vida Rural* 119:48–52.
- [5] Hanssen, I.M. *et al.*, 2010. Pepino mosaic virus: a successful pathogen that rapidly evolved from emerging to endemic in tomato crops. *Molecular Plant Pathology* 11:179-189.
- [6] Aguilar, J.M. *et al.*, 2002. Complete sequence of the Pepino mosaic virus RNA genome. *Archives of Virology* 147, 2009-2015.
- [7] Pico, B., *et al.* 2002. Widening the genetic basis of virus resistance in tomato. *Scientia Horticulturae* 94:73-89.

## Ciclos biogeoquímicos en humedales con diferente grado de eutrofización y su relación con factores de cambio climático: resultados experimentales en mesocosmos

M.C. Tercero-Gómez<sup>(1)</sup>, J. Álvarez-Rogel<sup>(1)</sup>, M.N. González-Alcaraz<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> 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, España. [carmen.tercero@upct.es](mailto:carmen.tercero@upct.es)

<sup>(2)</sup> Department of Ecological Science Faculty of Earth and Life Sciences VU University, De Boelelaan 1085 1081, HV Amsterdam, The Netherlands.

### RESUMEN

La presente propuesta de Tesis se centra en el estudio de procesos microbiológicos y biogeoquímicos ligados a ciclos del carbono y nutrientes en el sistema planta-suelo-agua de humedales afectados por aguas con diferente grado de eutrofización, a fin de determinar en qué medida la presencia o no de planta, la carga de nutrientes y los periodos de inundación-desección influyen en la capacidad de estos sistemas para secuestrar carbono y actuar, al mismo tiempo, como filtros verdes y si esta función afecta a la producción de gases de efecto invernadero (N<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>). El experimento se realizará en mesocosmos experimentales sometidos a periodos de inundación-desección con dos aguas de diferente composición, una con alta carga de nutrientes y otra con baja carga. Se harán tres repeticiones por tratamiento: sin planta+baja carga de nutrientes; sin planta+alta carga de nutrientes; con planta+baja carga de nutrientes y con planta+alta carga de nutrientes. La utilizada elegida será *Phragmites australis*. Se medirá regularmente Eh, pH y temperatura del suelo y paralelamente se extraerá la solución edáfica para el análisis de N, P, C y metales. Se tomaran muestras de suelo para el análisis químico y microbiológico. Se cogerán muestras de los gases emitidos desde la superficie para la determinación de las concentraciones de N<sub>2</sub>O y CH<sub>4</sub> y se medirá "in situ" el CO<sub>2</sub> desprendido. Además, se cuantificaran y analizarán los drenajes, recogidos tras cada período de inundación, y también se estudiará la descomposición de hojarasca mediante bolsitas de hojarasca.

**Palabras clave:** Filtros verdes; gases efecto invernadero; *Phragmites australis*; desnitrificación

### 1. Introducción

El papel que desempeñan los humedales frente a la contaminación por excesos de nutrientes en suelos y aguas es objeto de investigación desde hace décadas. Los suelos, generalmente de textura fina, la elevada biomasa vegetal y las reducidas tasas de mineralización de la materia orgánica a causa de la hidromorfía y la salinidad, confieren a estos ambientes una elevada capacidad de fijación de sustancias. Numerosas experiencias han demostrado su efectividad en la retención de excesos de nutrientes, por lo que los humedales se han considerado como filtros naturales, al depurar las aguas antes de que se viertan a los cauces principales o al mar, lo que proporciona evidentes beneficios sin que se requieran más inversiones que la adecuada conservación y manejo del propio ecosistema (de

ahí que muchas veces se les denomine *filtros verdes*).

Pero hay que tener en cuenta que los humedales son una de las principales fuentes emisoras de gases de efecto invernadero (N<sub>2</sub>O, CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>). Por un lado, cuando los suelos están saturados los procesos de respiración anaerobia de los microorganismos llevan a la emisión de N<sub>2</sub>O y CH<sub>4</sub>, siendo escasa la emisión de CO<sub>2</sub>. Por el contrario, cuando los humedales se drenan se produce la estimulación de la respiración aerobia y como consecuencia se dan picos de emisión de CO<sub>2</sub>. En este sentido, conocer el balance de carbono fijado como CO<sub>2</sub> frente al emitido como CO<sub>2</sub> y como CH<sub>4</sub> ayuda a valorar si los humedales están actuando como sumideros o emisores de carbono. Igualmente, conocer el balance entre la cantidad de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y fósforo retirados de un agua eutrofizada y el N<sub>2</sub>O emitido en los procesos de

respiración anaerobia ayuda a valorar en qué medida los aspectos negativos de estos sistemas pueden verse o no compensados por los positivos.

La Marina del Carmolí, un saladar perteneciente al término municipal de Cartagena (Murcia), es el mayor humedal de la costa del Mar Menor. A él van a parar diversos cauces cuyas aguas están eutrofizadas por exceso de nutrientes [1] que se van perdiendo al fluir a través del humedal [2,3], de manera que cuando llega al Mar Menor está prácticamente depurada. Estudios realizados en condiciones controladas han demostrado que la desnitrificación es el principal mecanismo por el que los nitratos son retirados del agua [4] jugando la vegetación un papel secundario.

El objetivo general de este trabajo es estudiar los procesos microbiológicos y biogeoquímicos ligados a los ciclos del N, P y C en el sistema planta-suelo-agua de humedales afectados por aguas con diferente grado de eutrofización, a fin de determinar en qué medida la presencia o no de planta (*Phragmites australis*), la carga de nutrientes y los periodos de inundación-desección influyen en la capacidad de estos sistemas para secuestrar C y actuar, al mismo tiempo, como filtros verdes y si esta función afecta a la producción de N<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>.

Los objetivos específicos se concretan en:

1. Determinar en qué medida los humedales actúan como depuradores de altas concentraciones de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>.
2. Determinar en qué medida la descomposición del "litter" procedente de *Phragmites australis* está influenciada por la presencia de elevados contenidos en N, P y carbono orgánico disuelto en el agua.
3. Determinar en qué medida la actividad microbiológica del suelo está influenciada por la presencia de elevados contenidos en N, P y carbono orgánico disuelto en aguas eutrofizadas y si esto está relacionado con la presencia o ausencia de planta.
4. Determinar en qué medida el desprendimiento del N<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> está influenciado por la presencia de elevados contenidos en N, P y carbono orgánico disuelto en aguas eutrofizadas y si esto está relacionado con la presencia o no de planta.
5. Determinar el impacto que puede causar sobre el balance de C orgánico, N y P en el sistema planta-suelo-agua de los humedales el hecho de

que éstos reciban agua eutrofizada y en qué medida dicho efecto puede estar condicionado por la presencia o no de planta.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Montaje de los mesocosmos

Los mesocosmos se fabricarán con metacrilato de 1 cm de espesor, de dimensiones 100x50x50 cm. Cada mesocosmos dispondrá de un grifo en uno de los laterales para poder ser drenados cuando corresponda. Se recubrirán con un plástico negro para simular la oscuridad del perfil del suelo.

### 2.2 Toma de muestras en el campo y su colocación en los mesocosmos

Los mesocosmos se rellenarán con suelo, arena y plantas de *Phragmites* recogidos en la Marina del Carmolí. Se colocará primero una capa de unos 15 cm de arena y encima de ella unos 25 cm del suelo, y en los tratamientos con carrizo, las plantas. De esta forma se tendrá: abajo un horizonte C arenoso y arriba un horizonte A de textura fina. El experimento se realizará en la ESEA de la ETSIA.

### 2.3 Equipamiento de los mesocosmos

Cada mesocosmos se equipará con:

- 3 electrodos de pH, y 3 de Eh, en el horizonte C y 3 de cada en el A.
- 6 sondas Rhizon® para la extracción de la solución edáfica en el horizonte C y 6 en el A.
- 2 anillos de PVC Ø10 y 5 cm de profundidad, insertados en la superficie para el posterior acoplamiento de cámaras para la recogida de los gases emanados desde el suelo.
- en cada uno se colocarán 32 bolsas de nylon con 2,5 g de hojarasca de *Phragmites* para estudiar su descomposición.

### 2.4 Desarrollo del experimento

#### 2.4.1 Tratamientos

El trabajo consistirá en someter a los mesocosmos a periodos de inundación-desección con 2 aguas de diferente carga de nutrientes y similar salinidad a lo largo de unos 12 meses, de manera que tengamos 6 períodos completos de inundación-desección. Las fases de inundación durarán unas 3-4 semanas y las de secado de 2 a 3 semanas.

La composición del agua con alta carga de nutrientes será:  $\text{NO}_3^- \sim 200 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\text{PO}_4^{3-} \sim 10 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\text{COD} \sim 100 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\text{Cl}^- \sim 2500 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\text{SO}_4^{2-} \sim 1000 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\text{Ca}^{2+} \sim 300 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\text{K}^+ \sim 100 \text{ mg L}^{-1}$  y  $\text{Na}^+ \sim 1500 \text{ mg L}^{-1}$ . La composición del agua con baja carga de nutrientes será en cuanto a  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y COD unas diez veces menor que la anterior y en cuanto a sales, similar al agua con alta carga de nutrientes.

#### 2.4.2 Parámetros a monitorizar durante el experimento.

- Regularmente en la solución del suelo. Valores de pH, Eh, CE,  $T^a$  y contenidos de nitrógeno y carbono disueltos totales (NDT y COS, respectivamente),  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , Fe, Mn, Pb y Zn.
- Regularmente en los drenajes. Valores de pH, CE y contenidos de NDT, COS,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , Fe, Mn, Pb y Zn.
- Regularmente en el suelo. Se determinará el carbono de la biomasa microbiana del suelo (CBM) y se monitorizarán diversas actividades enzimáticas: fenol oxidasa,  $\beta$ -glucosidasa, proteasa, quitinasa y deshidrogenasa.
- Al inicio y al final en el suelo. Los contenidos en carbono orgánico, nitrógeno y fósforo totales. Se hará una extracción secuencial de P para determinar en qué forma éste es retenido.
- Regularmente en los gases emanados desde el suelo. Se medirá el  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ .
- Regularmente en la hojarasca. Los contenidos en C, N, P y Fe, Mn, Pb y Zn.
- Al inicio y al final en la vegetación. La biomasa aérea y subterránea de *Phragmites*, así como los contenidos en C, N, P y Fe, Mn, Pb y Zn.

#### 2.4.3 Procedimientos para la toma de datos y muestras

- Medida de las condiciones físico-químicas. El pH y Eh se medirán, para cada profundidad, por medio de los electrodos instalados en los mesocosmos. La  $T^a$  se medirá en el horizonte A mediante termómetros insertados en el suelo en el momento de los muestreos.
- Recogida de la solución del suelo. Las muestras de la solución se recogerán por medio de los muestreadores Rhizon® acoplados a jeringas de succión.

- Recogida de los drenajes. Al finalizar cada fase de inundación se abrirán los grifos de los mesocosmos y se recogerán los drenajes en contenedores de plástico. Se cuantificará el volumen recogido y se tomarán las muestras para su análisis.

- Recogida de muestras de suelo. Al inicio y al final del experimento se recogerán muestras de suelo y arena para identificar los cambios en los contenidos de carbono orgánico, nitrógeno y fósforo totales. Para las muestras de superficie se extraerá un volumen conocido, a fin de determinar la densidad aparente y poder calcular los stocks totales de C, N y P en cada tratamiento. Además, cada vez que finalice un ciclo de inundación y un ciclo de secado también se recogerán muestras de suelo superficial para hacer el seguimiento de los parámetros microbiológicos.

- Recogida de los gases emanados desde el suelo. Para el muestreo de gases se utilizarán las cámaras de PVC descritas en el apartado 2.3. A primera hora de la mañana se acoplarán las cámaras sobre los anillos instalados en los mesocosmos. Con ayuda de una jeringa, se inyectarán en ellas unos 100 mL de acetileno, para bloquear la transformación del  $\text{N}_2\text{O}$  en  $\text{N}_2$  [5] y así poder detectar el primero de los gases en caso de que estuviera presente en la atmósfera de la cámara. Tras 2 horas se extraerán 10 mL de aire de las cámaras, que se inyectarán en un vacutainer para su posterior análisis. A las 4 h y a las 6 h se sacarán de nuevo muestras.

- Recogida de la hojarasca. Cada vez que finalice una fase de inundación y una de secado se recogerán 2 bolsas de hojarasca por cada mesocosmos. Se lavará, se secará a  $50^\circ\text{C}$  y se pesará para su cuantificación.

- Al final del experimento se recolectará toda la biomasa aérea de carrizo. Para cuantificar la biomasa subterránea se extraerá un volumen de suelo conocido de cada mesocosmos. Los resultados se presentarán como a biomasa seca la  $50^\circ\text{C}$ .

#### 2.4.4 Análisis

NDT y COS. Analizador TOC-VCSH Shimadzu.  $\text{NO}_3^-$ . Según [6],  $\text{NH}_4^+$  según [7] y  $\text{PO}_4^{3-}$  según [8].  $\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{CH}_4$  con un cromatógrafo de gases.  $\text{CO}_2$ . Se medirá "in situ" utilizando el equipo CIRAS-2. Carbono orgánico y nitrógeno totales. Analizador automático. Fósforo total por Fluorescencia de Rayos-X. Extracción secuencial de P según [9] y

[10]. Actividades enzimáticas y carbono de biomasa microbiana. Según [11] y [12] y [13].

### 3. Resultados Esperados y Discusión

Los resultados esperados del experimento serían los siguientes:

El potencial redox se espera que caiga en las inundaciones debido a condiciones de anoxia y que aumente en los periodos de secado al producirse condiciones óxicas.

Cabe esperar que *Phragmites* favorezca el intercambio gaseoso en el entorno rizosférico así como la movilidad de los solutos disueltos homogeneizando.

Se espera mayor actividad microbiana en los tratamientos con agua eutrofizada.

Se espera que la dinámica de los metales solubles esté ligada a los cambios en las condiciones redox.

Se espera una alta efectividad en la capacidad de depuración de los humedales independientemente del tratamiento. No obstante se espera un comportamiento diferente en cuanto al desprendimiento de gases de efecto invernadero y los procesos asociados con el comportamiento biogeoquímico y microbiológico: en los tratamientos con agua eutrofizada se espera una mayor emisión de N<sub>2</sub>O, CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>.

En cuanto al balance de carbono, se espera que los sistemas altamente eutrofizados probablemente tengan una respuesta distinta a los menos eutrofizados. El balance entre las tasas de descomposición y la acumulación de biomasa determinará su papel como sumideros de carbono.

### 4. Agradecimientos

Proyecto financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación. Referencia: CGL2010-20214

### 5. Referencias bibliográficas

[1] González-Alcaraz, M. N., Egea C., Jiménez-Cárceles, F. J., Párraga, I., María-Cervantes, A., Delgado, M. J., and Álvarez-Rogel, J. 2012. Storage of organic carbon, nitrogen and phosphorus in the soil-plant system of *Phragmites australis* stands from a eutrophicated Mediterranean salt marsh. *Geoderma* 185-186, 61-72.

[2] Álvarez-Rogel, J., Jiménez-Cárceles, F. J., Roca, M. J y Ortiz, R. 2007b. Changes in soils and vegetation in a Mediterranean coastal salt marsh impacted by human activities. *Estuar. Coast. Shelf S.*, 73, 510-526.

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

[4] González-Alcaraz, M. N., Conesa, H. M., Álvarez-Rogel, A., 2013. Nitrate removal from eutrophic wetlands polluted by metal-mine wastes: Effects of liming and plant growth. *J. Environ. Manage.* 128, 964-972.

[5] Groffman, P.M., Holland, E.A., Myrold, D.D., Robertson, G.P., Zou, X. 1999. Denitrification. En: Robertson, G.P., Coleman, D.C., Bledsoe, C.S., Sollins, P. (Eds.), *Standard soil methods for long-term ecological research*. Oxford University Press, New York. Pp. 272-288.

[6] A.O.A.C. 1975. Official methods of analysis. 12<sup>th</sup> edition. AOAC International. Arlington, Virginia, EEUU.

[7] NEIKER. 2005. Determinación del contenido de amonio en aguas, lixiviados y extractos. PEC/EN/A-059.

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

[9] Paludan, C. y Jensen, H.S. 1995. Sequential extraction of phosphorus in freshwater wetland and lake sediments: significance of humic acids. *Wetlands* 15, 365-373.

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

[11] Ladd, J. N., Brisbane, P. G., Butler, J. H. A., 1976. Studies on soil fumigation. 3. Effects on enzyme-activities, bacterial numbers and extractable ninhydrin reactive compounds. *Soil Biol. Biochem.* 8:255-260.

[12] Ravit, B., Ehrenfeld, J. G., Haggblom, M. M., 2003. A comparison of sediment microbial communities associated with *Phragmites australis* and *Spartina alterniflora* in two brackish wetlands of New Jersey. *Estuaries* 26(2B):165-474.

[13] Vance, E. D., Brookes, P. C., Jenkinson, D., 1987. An extraction method for measuring microbial biomass carbon. *Soil Biol. Biochem.* 19: 703-707.

SESIÓN IV



Ingeniería Agroforestal  
y Economía

PÓSTERS

## Evaluación y gestión sostenible de los espacios verdes urbanos a través de los servicios proporcionados por su ecosistema

S. Gómez, F. Alcón

Departamento de Economía de la Empresa, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena, Murcia, España.samu.ct@gmail.com

### RESUMEN

Uno de los principales retos socio-políticos más actuales es la consecución del uso sostenible de los recursos naturales. En este contexto el objetivo propuesto es entender y valorar las relaciones de la sociedad con los servicios proporcionados por los ecosistemas urbanos e hídricos y utilizar ese conocimiento para promover un uso sostenible de los recursos. Los estudios que se van a desarrollar estarán orientados a mejorar la gestión de los espacios verdes de la ciudad de Cartagena. Para la consecución del objetivo se evaluarán los factores socio-económicos y ambientales que influyen en el valor de las zonas verdes en la ciudad de Cartagena (Murcia) con el fin de poder determinar el valor económico total de los mismos y poder establecer una relación con los beneficios que aporta a la sociedad.

Los resultados obtenidos permitirán desarrollar políticas de gestión de los recursos disponibles en la ciudad que permitan establecer un protocolo de actuación sostenible sobre estas zonas verdes objeto del estudio.

**Palabras clave:** servicios ecosistémicos; valoración contingente; parques y jardines.

### 1. Introducción

Desde el lanzamiento de la Evaluación de los Ecosistemas del Milenio [4], los ecosistemas han sido ampliamente reconocidos como activos de capital natural de apoyo y prestación de servicios, los cuales son de gran valor para los seres humanos. Hay un creciente reconocimiento de la función que desempeñan los ecosistemas en el suministro de bienes y servicios que contribuyen al bienestar humano, y de los efectos de las acciones humanas sobre los ecosistemas. La estimación del valor económico total de los servicios ecosistémicos desempeñan un papel importante en la conservación y mantenimiento básico de los ecosistemas [5, 6, 8], siendo de gran relevancia para la política y toma de decisiones a nivel local, nacional y global [7].

El desconocimiento del valor de un recurso puede conducir al detrimento y agotamiento de los servicios ecosistémicos. Como consecuencia, el enfoque por la Evaluación de Ecosistemas del Milenio [4] está siendo cada vez más aceptado tanto a nivel académico como político. Esta aceptación ha producido un crecimiento exponencial en los estudios que abarcan el marco de la Evaluación de Ecosistemas [2, 3].

En este sentido, los espacios verdes urbanos van a proporcionar unos servicios sociales y ambientales relacionados con su uso, y con el no uso de los mismos. A pesar de la importancia que tienen estos espacios y de los servicios que proporcionan para la ciudadanía, la comunidad científica no ha profundizado en esta materia. Tampoco se ha valorado el papel del agua en estos servicios en zonas de escasez.

Sin embargo, en zonas semiáridas donde el uso de agua de riego es necesario para el sostenimiento social y la escasez de agua es predominante, el mantenimiento de estos espacios verdes se puede ver comprometido debido a la elevada demanda de agua y sus asociados costes de mantenimiento.

A pesar de que existen otras opciones para crear incentivos económicos que permitan ahorrar agua, las cuestiones equitativas son críticas en el desarrollo de instrumentos efectivos y políticamente aceptables. Además, los instrumentos económicos no pueden actuar por sí mismos de forma aislada, sino que deberán estar enmarcados dentro de un contexto institucional en el cual se definan los derechos de propiedad y el conjunto de normas y reglas que lo regulan.



## 2. Materiales y Métodos

El estudio se realizará dentro del Término Municipal de Cartagena, en la Región de Murcia, situado al sureste de España. Este Término Municipal dispone de algo más de 3 millones de Zonas Verdes según el Plan de Ordenación General Urbana (P.G.O.U.) de Urbanismo del Ayuntamiento de Cartagena, superficie sobre la que se mantiene ajardinada aproximadamente la mitad la misma, lo que supone para los 220.000 habitantes del mismo en torno a 7m<sup>2</sup> de espacios verdes urbanos por habitante.

La Organización Mundial de la Salud recomienda, entre otras cosas, evitar zonas desprovistas de vegetación sobredotadas de equipos e instalaciones o disponer de un ratio de proporcionalidad mínimo comprendido entre 15 m<sup>2</sup> y 20 m<sup>2</sup> de jardines por habitante.

Para la consecución del objetivo de la tesis se realizará una exhaustiva revisión de la literatura sobre opciones políticas que promuevan la gestión sostenible de los espacios verdes urbanos y el uso sostenible del agua, tanto desde el punto de vista de la oferta como de la demanda, así como de estudios de valoración sobre espacios verdes urbanos realizados internacionalmente.

Se identificarán métodos de gestión de los espacios verdes urbanos, en base a criterios de sostenibilidad socio-económica y ambiental, y se estimarán los beneficios asociados a los servicios ecosistémicos que proporcionan los espacios verdes urbanos. Se cuantificará el valor económico total, que incluye tanto valores de uso como de no uso, asociado a dichos espacios en la ciudad de Cartagena (Murcia) donde existen numerosos jardines históricos. Para ello se emplearán de técnicas de valoración que permitan determinar la relación existente entre dichos valores y los beneficios que aportan los espacios verdes a la sociedad [1] como los métodos de preferencias establecidas. Por otra parte, también se estudiara la heterogeneidad en la demanda de estos servicios, lo que permitirá la introducción de políticas de gestión integradas en el contexto social e institucional y acordes con un proceso de participación pública.

Posteriormente se identificarán los servicios asociados a estos ecosistemas y los costes de mantenimiento, prestando especial interés al uso del agua y a su coste de oportunidad. A continuación se llevará a cabo un estudio basado en la aplicación de métodos de

preferencias establecidas dirigidas a los diferentes agentes implicados. Finalmente, estas estimaciones se integrarán en un Análisis Coste-Beneficio que permitirá evaluar de forma global las contribuciones al bienestar social de los espacios verdes urbanos.

Los resultados del estudio durarán 3 años y proporcionarán información relativa a los costes y beneficios que proporcionan los servicios ecosistémicos de los diversos espacios verdes urbanos de la zona de estudio y el beneficio asociado a la asignación del uso del agua. Así mismo, esto permitirá proporcionar información útil a los responsables de la asignación de recursos naturales y económicos para que puedan realizar una asignación de los mismos eficiente y sostenible.

Los resultados globales permitirán la elaboración de un nuevo diseño de las estructuras de gestión los espacios verdes urbanos y del uso del agua de riego sostenible que permitirá a los responsables de la toma de decisiones realizar políticas de gestión de los recursos naturales eficientes, equitativas y sostenibles que permitan un equilibrio económico, social y ambiental de dichos espacios verdes urbanos.

Los datos obtenidos serán recopilados de forma aleatoria entre diferentes grupos de la sociedad en el Término Municipal de Cartagena y las estimaciones se realizarán con el programa estadístico *Stata*.

La dirección del trabajo se llevará a cabo por el Profesor del Departamento de Economía de la Empresa, D. Francisco José Alcón Provencio perteneciente al grupo de Investigación D018-01, Economía Agraria.

## 3. Resultados y Discusión

Con este trabajo se espera obtener unos valores significativos que permitan determinar la relación coste-beneficio asociada a los espacios verdes urbanos del Municipio de Cartagena y a los servicios que proporcionan a la sociedad. Estos valores, junto al patrón de heterogeneidad de la demanda de servicios, permitirá establecer nuevas políticas de gestión de los recursos disponibles en la ciudad y crear nuevos protocolos de actuación sostenible sobre todas estas zonas verdes objeto del estudio.

## 5. Agradecimientos

Agradecemos el interés y disposición colaboradora de la Unidad de Parques y Jardines del Excelentísimo Ayuntamiento de Cartagena, a través de su Jefe del Servicio D. Miguel Alberto Guillén Pérez.

## 6. Referencias bibliográficas

[1] Bateman, I. J., Carson, R. T., Day, B., Hanemann, N., Hanley, N., Hett, T., Jones-Lee, M., Loomes, G., Mourato, S., Özdemiroglu, E., Pearce, D. W., Sugden, R. & Swanson, J. (2002). *Economic Valuation with Stated Preference Techniques: A Manual*. Edward Elgar, Cheltenham, UK.

[2] De Groot, R.S., Wilson, M.A., Boumans, R.M.J., 2002. Typology for the classification, description and valuation of ecosystem functions, goods and services. *Ecol. Econ.* 41, 393–408.

[3] Fisher, B., Turner, K.R., Morling, P., 2009. Defining and classifying ecosystem services for decision making. *Ecol. Econ.* 68 (3), 643–653.

[4] MA, Millennium Ecosystem Assessment, 2005. *Ecosystems and human well-being: current state and trends*. Island Press, Washington, DC.

[5] Plummer, M.L., 2009. Assessing benefit transfer for the valuation of ecosystem services. *Frontiers Ecol. Environ.* 7 (1), 38–45.

[6] Stenger, A., Harou, P., Navrud, S., 2009. Valuing environmental goods and services derived from the forests. *J. Forest Econ.* 1 (1), 1–14.

[7] Turner, R.K., Morse-Jones, S., Fisher, B., 2010. Ecosystem valuation, a sequential decision support system and quality assessment issues. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1185, 79–101.

[8] Turner, W.R., Brandon, T., Brooks, M., Costanza, R., Da Fonseca, G.A.B., Portela, R., 2007. Global conservation of biodiversity and ecosystem services. *BioScience* 57, 868–873.



**Figura 1.** Jardín Histórico “El Huerto de las Bolas”.



**Figura 2.** Parque de los Juncos.

## Satellite-based Algorithms for Estimating Actual Evapotranspiration. Application to Irrigation Management and Water Accounting in the Segura Basin

J.A. Martínez <sup>(1)</sup>, S.G. García Galiano <sup>(1)</sup>, A. Baille <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Unidad Predepartamental de Ingeniería Civil, Grupo de I+D Gestión de Recursos Hídricos.

<sup>(2)</sup>Departamento de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola. Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 52, 30203 Cartagena. España

### RESUMEN

Se ha considerado a la Cuenca del Río Segura, localizada en el Sureste de España, como área de estudio. En esta cuenca semiárida las necesidades hídricas del sector agrícola representan el 80 % del uso total del agua. El aumento de fiabilidad en la estimación de la evapotranspiración real ( $ET_{real}$ ), se traduce en mayor conocimiento de la necesidad hídrica real del cultivo. Se propone estimar  $ET_{real}$  aplicando algoritmos que permitan el cambio de escala (upscaling): (i) a escala de parcela donde se dispone de imágenes de alta resolución espacial Landsat (e incluso Sentinel cuando esté disponible), y de datos al suelo medidos en parcelas experimentales para realizar validaciones de resultados,(ii) a escala de cuenca y en base a imágenes de moderada resolución espacial (sensor MODIS) y alta resolución temporal, aplicando los algoritmos previamente validados, y su integración para el cierre de los balances hídricos a escala mensual. Esta información se integrará con datos del Plan Hidrológico de la Cuenca del Río Segura y otras fuentes de información. El objetivo es obtener, evaluar y estandarizar información detallada, incluyendo trasvases y recursos desde otras fuentes no convencionales con el fin de analizar y demostrar el potencial de la gestión, y las medidas para reducir la escasez hídrica en esta región propensa a la sequía. El Sistema de Contabilidad Hídrica (SCH) para la cuenca, complementará los balances de recursos hídricos a nivel europeo con datos locales mediante una solución innovadora en base a Sistemas Información Geográfica (SIG).

**Palabras clave:** Sistemas de Información Geográfica, imágenes de satélite, balance hídrico, Sistema de Contabilidad Hídrica.

### 1. Introducción y Objetivos

La Cuenca del Río Segura (Fig. 1), caracterizada por un clima semiárido, ha sufrido una profunda transformación espacial debido a un incremento de la superficie regada en zonas donde no existen cauces de régimen permanente. En esta cuenca el sector agrícola (regadíos) representa cerca de 80% de la demanda total de agua de la Cuenca [5] por lo que el conocimiento y seguimiento de las diferentes demandas agrícola es fundamental para el uso racional del recurso.

En este contexto, el seguimiento y la cartografía de la evapotranspiración real ( $ET_{real}$ ) a partir de información satelital representa una fuente de información valiosa para los agricultores como para las Comunidades de Regantes y las Confederaciones Hidrográficas.

Los objetivos son (i) estado del arte en la estimación de  $ET_{real}$  desde teledetección, y su aplicación en la estimación de necesidades

hídricas de los cultivos, recopilar y evaluar la disponibilidad de agua de datos y las demandas, tanto en el tiempo, el espacio y en el ámbito sectorial, principalmente de existentes estudios y documentos (ii) desarrollar una herramienta (modelo de datos e integración en Sistema de Información Geográfica o SIG) que permita incorporar los mapas de  $ET_{real}$  en un Sistema de Contabilidad Hídrica (SCH) a escala de cuenca; y finalmente (iii) integrar SCH con datos del plan hidrológico de cuenca, demostrando el potencial de las medidas de gestión y tecnológicas para luchar contra la escasez hídrica y sequía a escala de demarcación hidrográfica y su uso para la planificación local.

Para ello se prevé aplicar metodologías para la estimación y la cartografía de  $ET_{real}$  a partir de imágenes satelitales de media y alta resolución espacial. En una primera etapa, se validan los algoritmos integrados en un entorno SIG, con medidas de  $ET_{real}$  llevadas a cabo con la técnica

de covarianza de remolinos en dos parcelas de naranjos del Campo de Cartagena (ubicada en la Cuenca del Río Segura). En una segunda etapa, se aplican los algoritmos validados para estimar las distribuciones espacio-temporales de  $ET_{real}$  a escala de cuenca y para un período largo de tiempo (10-15 años). En una tercera etapa, se incorporan los mapas de  $ET_{real}$  a escala de cuenca en un modelo de datos diseñado para facilitar la aplicación del SCH para la Cuenca del Segura. Este sistema complementará los balances de recursos a nivel europeo con datos locales integrando datos del Plan Hidrológico de Cuenca (PHC) y otras fuentes de información.

El SCH se trata de una herramienta innovadora desarrollada en base a un modelo de datos integrado en un SIG que proporcionará información alfanumérica y espacial (vectorial y ráster) que se utilizará para la gestión eficiente y racional del uso del agua. Los objetivos en este aspecto se pueden identificar: - definir niveles de agregación de información, - generar un modelo de datos relacional que asocie la información espacial y la alfanumérica, y - definir resultados espaciales y alfanuméricos. Estos datos espaciales se procesarán de acuerdo con los de interoperabilidad y servicios de datos definidos por la Directiva Europea INSPIRE [3].

## 2. Materiales y Métodos

Distintos modelos de estimación de evapotranspiración a partir de imágenes de satélite se aplicarán a diferentes escalas espaciales, desde nivel de parcela a nivel de cuenca. En primer lugar, será necesaria la corrección radiométrica de las imágenes de satélite de alta resolución espacial. Las mismas consisten en: correcciones atmosféricas, de emisividad, máscaras de nubes, y corrección topográfica en base a un Modelo Digital de Elevación (MDE) y sus atributos topográficos derivados [1]. Se obtienen variables como índices de vegetación, fracción de cobertura vegetal, emisividad y/o demás variables requeridas para la aplicación de los algoritmos propuestos.

Para su validación se emplearán medidas de  $ET_{real}$  llevadas a cabo en dos fincas comerciales de naranjos, situadas en la comarca de Pozo Estrecho. Ambas parcelas están equipadas con torres de flujos (Fig. 2) que miden  $ET_{real}$  con la técnica de covarianza de remolinos (eddy-covariance). Validados dichos algoritmos se aplicarán a imágenes de satélite de baja resolución espacial, considerando una serie

temporal larga de un periodo mínimo de al menos 10 años de datos.

Para ello será necesario recopilar información adicional, como por ejemplo valores de temperaturas (mínimas, medias y máximas diarias), así como otros indicadores necesarios para la corrección radiométrica de imágenes de satélite.

Dichos algoritmos serán incorporados al toolbox SORPRESA (Sistema Operacional Regional de PRevisión de Efectos de Sequías Agudas, [2]) programado en Tcl/Tk y bajo el SIG GRASS (Geographical Resources Analysis Support System).

Una vez obtenidos los datos de evapotranspiración, se recopilará y evaluará la disponibilidad de datos de usos del agua y demandas para la estimación de necesidades hídricas de los cultivos y el cierre de balances hídricos siguiendo la metodología del Sistema de Contabilidad Ambiental y Económica para el agua (SCAE-Agua, [4])

Toda esta información georreferenciada, así como los balances hídricos, se integrará en una base de datos espacio-temporal, para lo que será necesario el diseño e implementación de un modelo de datos relacional que permita de forma precisa la comprensión de los datos, de acuerdo a la Directiva Europea INSPIRE [3].

Esta información será implementada y disponible en el SCH para la Cuenca del Segura que proporcionará información alfanumérica y espacial (vectorial y ráster) que se utilizará para la gestión eficiente y racional del uso del agua.

## 3. Resultados y Discusión

Con este trabajo se pretende demostrar que es posible estimar  $ET_{real}$  con una buena precisión en base casi exclusivamente a la información proporcionada por imágenes satelitales y con la suficiente resolución espacial para detectar la variabilidad espacial de  $ET_{real}$  y de otros indicadores biofísicos a escala de parcela.

En este sentido, uno de los objetivos que se plantea es la identificación de patrones espaciales y sectores con problemas de uniformidad de riego (riego insuficiente o excesivo), así como de estrés hídrico.

A partir de esta información, considerando incluso la provista por el PHC y otras fuentes, será posible la estimación de necesidades agrícolas y el cierre de balances hídricos regionales.

#### 4. Conclusiones

La determinación de la distribución espacial de parámetros biofísicos de la superficie terrestre a partir de imágenes de satélite permite el seguimiento de la dinámica de la vegetación natural y de los cultivos, y de su estado fisiológico (estrés hídrico, entre otros).

Esta información es de gran utilidad no sólo para realizar recomendaciones de riego e identificar zonas con estrés hídrico, sino también para estimar necesidades hídricas y derivar componentes del balance hidrológico.

Mediante el presente trabajo se demuestra el potencial de las medidas de gestión, tecnológicas y económicas para reducir la escasez hídrica en esta Región propensa a la sequía.

#### 5. Agradecimientos

Se agradece el soporte recibido desde el proyecto del Plan Nacional CGL2012-39895-C02-01, "Evaluación de la variabilidad hidrológica desde combinaciones multimodelo climáticas regionales (HYDROCLIM)", financiado por la Secretaría de Estado de Investigación del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), y fondos FEDER.

#### 6. Referencias bibliográficas

[1] Chuvieco, E., Hantson, S., 2010. Procesamiento estándar de imágenes Landsat. Documento técnico de algoritmos a aplicar. Version1. Plan Nacional de Teledetección. Instituto Geográfico Nacional. On line. <http://www.ign.es/PNT/pdf/especificaciones-tecnicas-pnt-mediante-landsat-v2-2010.pdf>

[2] García Galiano, S.G., Baille, A., González, M.M., Martínez, V., Urrea, M., Hernández, Z., Nortes, P., y Tanguy, M. 2007. Desarrollo y Aplicación de Indicadores de Alerta Temprana frente a Sequías a Escala Regional desde MODIS. XII Congreso de la Asociación Española de Teledetección. Teledetección. Hacia un mejor entendimiento de la dinámica global y regional, Ed. Martín. 223-229.

[3] INSPIRE 2007. Infraestructure for Spatial Information in Europe. On line <http://inspire.jrc.ec.europa.eu/>

[4] SCAE-Agua 2013. Sistema de Contabilidad Ambiental y Económica para el agua. On line. <http://unstats.un.org/unsd/envaccounting/see>

aw/ [5] Urrea Mallebrera, M., Mérida Abril, A., García Galiano, S.G., 2011. Segura River Basin: Spanish Pilot River Basin Regarding Water Scarcity and Droughts. In: Agricultural Drought Indices. Proceedings of the WMO/UNISDR Expert Group Meeting on Agricultural Drought Indices. Sivakumar, Mannava V.K., Raymond P. Motha, Donald A. Wilhite and Deborah A. Wood (Eds.), 2-4 June 2010, Murcia, Spain: Geneva, Switzerland: World Meteorological Organization. AGM-11, WMO/TD No. 1572; WAOB-2011. 219 pp: 2-12

#### Tablas y Figuras



**Figura 1.** Cuenca del Río Segura: Mosaico Landsat combinación falso color, bandas 432. (Junio 2011).



**Figura 2.** Imagen de torre de flujo en parcela.

## Estudio de la depuración de las aguas. Caso de estudio de la Región de Murcia

A. Montesinos, M.D. de-Miguel

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena. España. ana.montesinosnavarro@gmail.com

### RESUMEN

El agua es un recurso muy escaso, principalmente en la Región de Murcia. Región, que ha sabido introducir innovaciones tecnológicas y ha manifestado una clara disposición por la reutilización del agua para aprovechar al máximo ese recurso tan escaso. Es por ello que este trabajo pretende realizar un análisis de la evolución de la depuración de las aguas residuales durante los últimos diez años, y los actuales métodos de tratamiento, analizando el origen de las aguas y el destino posterior, tanto del efluente como de los fangos. Con la finalidad de determinar la eficiencia en este proceso en cumplimiento de la Directiva Marco de Agua.

La reutilización del agua dependerá del nivel de tratamiento al que ésta haya sido sometida. Actualmente, el rendimiento en depuración se ha incrementado en un 17,38 % de efectividad, lo que conlleva que haya una mayor reutilización del recurso hídrico, sobretodo en el sector agrario.

**Palabras clave:** Recurso hídrico; Reutilización; Eficiencia.

### 1. Introducción

El agua no se ha considerado, hasta ahora, un bien comercial como los demás, sino un patrimonio que hay que proteger, defender y tratar como tal [1]. Es fundamental para satisfacer las necesidades humanas básicas, la salud, la producción de alimento, la energía y el mantenimiento de los ecosistemas regionales, nacionales y mundiales.

El agua como recurso limitado requiere un uso eficiente para poder satisfacer las demandas, respetando el medio ambiente.

El estudio del recurso hídrico en España, ha tenido y sigue teniendo gran importancia, como consecuencia de las irregularidades de las condiciones hidrológicas de las diferentes zonas. El aumento de consumo, la diferente disponibilidad de las aguas según la cuenca, la creciente contaminación y la salinización de las aguas subterráneas son algunas de las piezas claves que componen el mosaico de la problemática que se genera alrededor del agua en España.

Debido al cambio climático, las estimaciones solventes cifran entre un 10% y un 20% la disminución media en las aportaciones a las cuencas, esta delicada situación hídrica es cada vez más precaria, ya que los episodios de sequía

se suceden con mayor frecuencia, afectando más severamente al sureste y litoral del mediterráneo español [2].

La reutilización del agua es cada vez más importante e imprescindible, debido a los largos períodos de sequías lo que provoca una gran escasez del recurso hídrico, a la sobreexplotación de los acuíferos [3] y a la concienciación de la ciudadanía de no generar más aportes peligrosos y nocivos al medio ambiente.

En 1991, por medio de la Directiva 91/271/CEE [4], se establecen las medidas necesarias para garantizar la correcta recogida y tratamiento de las aguas residuales urbanas antes de su vertido, quedando emplazados los países miembros de la Unión Europea a adecuar los sistemas de saneamiento y depuración en todas sus poblaciones mayores de 2.000 habitantes equivalentes (h-e) antes del año 2005.

Los problemas de calidad de las aguas en la Región de Murcia se deben fundamentalmente a la actividad agraria, como consecuencia de la utilización de fertilizantes y plaguicidas, y por los vertidos tanto industriales como urbanos.

La Ley 3/2000 de Saneamiento y Depuración de aguas residuales de la Región de Murcia [5], diseña un nuevo sistema de gestión para la

resolución de los problemas planteados por la contaminación procedente de las aguas residuales urbanas.

La Entidad Regional de Saneamiento y Depuración de Aguas Residuales, es la encargada de llevar a cabo todas las tareas de gestión, conservación, explotación y control de las instalaciones públicas de saneamiento y depuración de la región.

El vertido a cauces naturales de las aguas depuradas, la inexistencia de caudales permanentes y abundantes en la práctica totalidad del sistema de drenaje superficial, obligan a tratar de conseguir unos resultados de depuración más exigentes.

En el sector agrario, debido a la deficitaria situación hídrica de las zonas regables, se encuentra en la necesidad de la reutilización directa para regadío de las aguas depuradas[6], cuyos tratamientos deben de dejar las aguas en condiciones óptimas que permitan su uso con garantías para la salud.

Para que los tratamientos realizados en las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) sean efectivos debe de haber un grado de eliminación de los siguientes parámetros contaminantes del agua: Demanda Química de Oxígeno (DQO), Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO<sub>5</sub>), Sólidos en suspensión (SS), Nitrógeno y Fósforo, siendo la eliminación de los tres primeros más propia de la depuración convencional y los dos últimos de la depuración convencional con tratamiento terciario.

Este trabajo tiene por finalidad analizar la evolución de la depuración de aguas residuales en la Región de Murcia en los últimos diez años, estudiando su nivel de eficiencia según el tipo de tratamiento y las características de cada uno de los municipios y determinando si el método de depuración es el adecuado.

## 2. Materiales y Métodos

El desarrollo de este trabajo consiste en el estudio de la evolución de la depuración de las aguas residuales, más concretamente en el caso de la Región de Murcia, para ello es necesario realizar una revisión bibliográfica del estado de arte de la depuración de las aguas residuales a nivel regional, nacional y de la Unión Europea.

Para obtener un juicio de valor de aproximación sobre la situación existente, se recabará la opinión y la información de los stakeholders. Ya

que nos pueden dar una información más directa y cercana sobre este tema.

## 3. Resultados y Discusión

La población residente en la Región de Murcia asciende a 1.472.049 habitantes [7], distribuida en 45 municipios, con 727 núcleos de población de muy diferente magnitud. Estos núcleos, entre los que se incluyen barriadas, pedanías, núcleos rurales, etc., se agrupan a los efectos de recogida y tratamiento de sus aguas residuales en las 221 Aglomeraciones Urbanas existentes en la Región de Murcia (Tabla 1).

De las 116,16 Hm<sup>3</sup> de volumen generado de aguas, un alto porcentaje, el 99,1%, de las aglomeraciones urbanas tiene un sistema de saneamiento y depuración adecuado [8].

La Región de Murcia, de acuerdo con la normativa establecida en la Directiva Marco de Agua, estableció un Plan General de Saneamiento y Depuración (2001-2010) para la dotación de infraestructuras de saneamiento a los sistemas urbanos, cuyo plazo culminó en el año 2010.

Concluido este plazo, el total de instalaciones en el año 2012 es de 88, [8], contemplándose varios tipos de tratamiento que se refleja en la Tabla 2.

Estos métodos de depuración han ido variando a lo largo de los años, tomando cada vez más relevancia la depuración biológica con tratamiento terciario en detrimento de la depuración biológica, especialmente a partir del año 2009, a diferencia de los otros tratamientos que tiene poca significatividad. En la Figura 1, queda patente que la Región ha optado por el tratamiento terciario en el 59,09 % de sus estaciones depuradoras, lo que favorece su posterior reutilización, sobre todo para usos agrícolas, permitiendo el incremento de los recursos disponibles y minimizando el impacto en el medio ambiente.

La evolución progresiva del número de tratamientos, ha incrementado el volumen de aguas residuales tratadas y mejorado el rendimiento medio de calidad de las aguas para su posterior reutilización, recuperando casi toda la totalidad de sus aguas. Con porcentajes del 27,14%, 13,42% y 17,38%, respectivamente, según se desprende de la observación de la Tabla 3.

Evidentemente, el aumento de EDAR con tratamiento terciario, así como el mayor rendimiento en la recuperación de las aguas, conllevan un aumento en el precio del m<sup>3</sup> del agua tratada debido a los costes de explotación y mantenimiento, en el que también se incluyen, los gastos de explotación de las diferentes estaciones de bombeo de aguas residuales (EBAR) y colectores generales. En la Figura 2, se observa esta subida de precio en los últimos años.

En los seis primeros años el aumento del precio es muy elevado, pagándose el máximo en los años 2009 y 2010, coincidiendo con el momento en el que más estaciones depuradoras había activas cuyo nivel de tratamiento es el terciario.

#### 4. Conclusiones

En la Región de Murcia, el agua presenta dos problemas, fundamentalmente, que es un bien escaso, cuyas dificultades de obtención se ponen muy de manifiesto en época de sequía y el deterioro de la calidad de las aguas debido a los vertidos procedentes de las aglomeraciones urbanas. Por lo tanto, es necesaria su depuración para su posterior reutilización.

Sólo un 0,9 % de las aglomeraciones urbanas de la Comunidad Autónoma, se encuentra sin ningún sistema de saneamiento o depuración o en proyecto de tenerlo.

Con un porcentaje de un 35,59%, las estaciones depuradoras con tratamiento terciario son las que han tenido un mayor crecimiento con respecto a los demás métodos de depuración, que han ido decreciendo en los últimos años.

El rendimiento de las EDAR para obtener una calidad de las aguas óptima es del 98,6%.

El precio de depuración de m<sup>3</sup> de agua, es muy elevado, aumentando en los seis primeros años objeto de estudio en 0,15 €/m<sup>3</sup>.

#### 5. Agradecimientos

Al proyecto GEAMED, (AGL2010-22221-C02-01). Financiado por el M<sup>º</sup> de Economía y Competividad y Fondos FEDER.

#### 6. Referencias bibliográficas

[1] Directiva 2000/60/CE, del Parlamento Europeo y del Consejo, del 23 de octubre, por la que se establece un marco comunitario de

actuación en la política de aguas. Directiva Marco del Agua.

[2] MAGRAMA, 2007. Estado y evolución del medio ambiente. Memoria “Medio Ambiente en España 2007”.

URL:[http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-ambientales/mem07\\_3\\_2\\_1diagnosituacion\\_tc\\_m7-15411.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-ambientales/mem07_3_2_1diagnosituacion_tc_m7-15411.pdf)

[3] Melián-Navarro A., de-Miguel M.D., Navarro-Caballero T. 2013. Calidad de las aguas subterráneas en las Unidades Hidrogeológicas de la Vega Baja del Segura (Alicante). Comunicación XXXI Congreso Nacional de Riegos.

[4] Directiva del Consejo 91/271/CEE de Mayo de 1991, sobre el tratamiento de aguas residuales.

[5] Ley 3/2000 de Saneamiento y Depuración de aguas residuales de la Región de Murcia e implantación del canon de saneamiento.

[6] Alcón F., Martín-Ortega J., Berbel J., de-Miguel M.D. 2012. Environmental benefits of reclaimed water: an economic assessment in the context of the Water Framework Directive. Water Policy 14 (148-159).

[7] Instituto Nacional de Estadística, 2013. Consulta realizada a 9 de Mayo de 2014 en el link: <http://www.ine.es/jaxi/tabla.do>

[8] Entidad Regional de Saneamiento y Depuración de Aguas Residuales, 2014. Consulta realizada a 8 de Mayo de 2014 en el link: [http://www.esamur.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=27&Itemid=36](http://www.esamur.com/index.php?option=com_content&view=article&id=27&Itemid=36)

#### Tablas y Figuras

**Tabla 1.** Saneamiento y depuración de aguas en aglomeraciones urbanas. 2014.

Aglomeraciones Urbanas	Número	Volumen Generado (hm <sup>3</sup> )	%
Con sistemas de saneamiento y depuración adecuado	118	115,08	99,1
Sin saneamiento o con sistema en proyecto	103	1,08	0,9

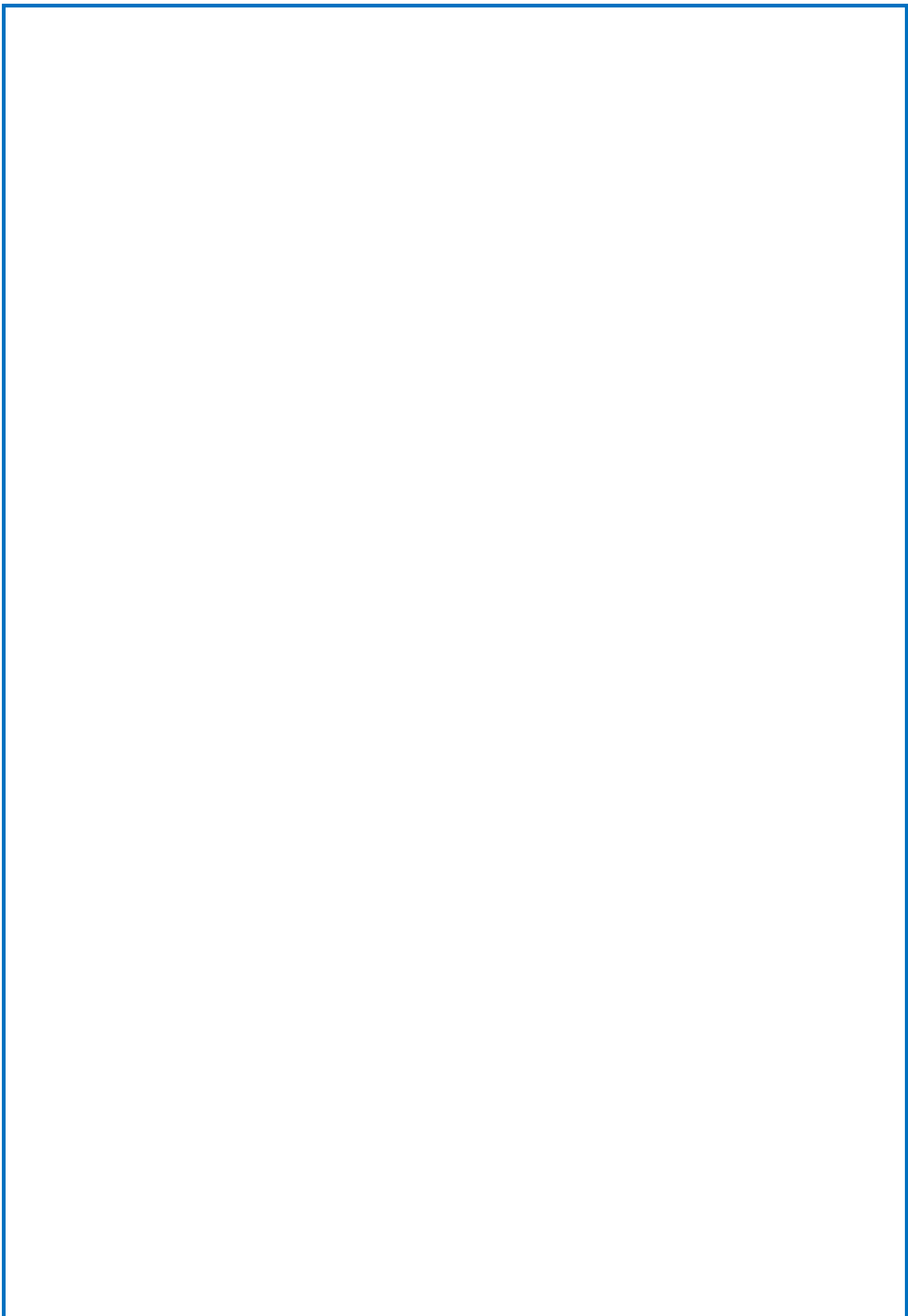


**Tabla 2.** Tipos de tratamiento.

<b>Tipo</b>	<b>Número de Instalaciones</b>	<b>Volumen depurado (Hm3/año)</b>	<b>%</b>
Depuración Biológica	34	57,953	53,0%
Depuración Biológica con tratamiento terciario	52	49,980	45,7%
Plantas de Lagunaje	1	1,437	1,3%
Plantas con tratamiento primario o en construcción	1	0,037	0,03%
<b>Totales</b>	<b>88</b>	<b>109,407</b>	<b>100%</b>

**Tabla 3.** Evolución de las infraestructuras de tratamiento. 2012.

	<b>Nº de E.D.A.R. activas</b>	<b>Volumen tratado (Hm3/año)</b>	<b>Rendimiento medio obtenido (%)</b>
2003	70	96,1	84
2004	74	106,1	87,8
2005	76	105,7	89
2006	80	100,7	92
2007	83	102,5	94,4
2008	89	99,6	97,6
2009	96	102,1	97,9
2010	97	110,9	97,9
2011	91	115,1	98,4
2012	88	109,7	98,6



# III WORKSHOP EN INVESTIGACIÓN AGROALIMENTARIA



**Escuela Técnica  
Superior de  
Ingeniería  
Agronómica**



Programa de Doctorado en Técnicas Avanzadas en  
Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario - TAI+DA