



ETSIA

Escuela Técnica
Superior
de Ingeniería
Agronómica

Proceedings of the 8th WORKSHOP ON AGRI-FOOD RESEARCH for young researchers



WIA:19



Universidad
Politécnica
de Cartagena

Proceedings of the 8th WORKSHOP ON AGRI-FOOD RESEARCH for young researchers

WiA.19



Acknowledgements

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

©2020 Programa de Doctorado en TAIDA
©2020, Universidad Politécnica de Cartagena
CRAI Biblioteca
Plaza del Hospital,1
30202 Cartagena
968325908
ediciones@upct.es



Primera edición, 2020
ISBN: 978-84-17853-08-2

Technical Editors / Organizing and Scientific Committee

Dr. Francisco Artés-Hernández (Convener)
Dr. Juan A. Fernández-Hernández
Dr. Raúl Zorzona Belmonte
Dr. Paula María Periago Bayonas
Dr. Juan José Alarcón Cabañero
Dra. José Enrique Cos Terror

Doctorate Program in Advanced Techniques for Research and Development in Food and Agriculture (TAIDA). Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica (ETSIA). Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT)
www.upct.es/estudios/doctorado/3470/



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

Prefaces

As Convener of the Organizing and Scientific Committee of the 8th Workshop on Agri-Food Research for young researchers (WIA2019) and Coordinator of the Doctoral Program in Advanced Techniques for Research and Development in Food and Agriculture (TAIDA), I feel again very proud to see in this proceedings book the brilliant presentations conducted by the PhD candidates of our Program. Presentations showed a great scientific interest and reflect the outstanding potential of the Research Groups involved in the TAIDA PhD Program belonging to several institutions of the Murcia Region (UPCT, CEBAS-CSIC and IMIDA). We expect that during the celebration of this Workshop, the cohabitation and exchange of ideas and experiences among PhD candidates, research groups, researchers, technicians, etc. have been favored.

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

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

Prof. Francisco Artés-Hernández PhD

Convener of the 8th Workshop on Agri-Food Research (WIA2019)

Universidad Politécnica de Cartagena

As Director of the International Doctoral School, I consider that it is of paramount importance for the preparation of our PhD students to develop and increase the skills needed to succeed in their PhD degree.

Among the most relevant skills for students are the ability to analyse, summarise, present and discuss their scientific achievements in front of a specialised audience. In this respect, the Workshop on Agri-Food Research (WIA) has become over the last years an excellent opportunity for PhD students of the Doctoral Program “Advanced Techniques for Research and Development in Food and Agriculture” (TAIDA) to present and discuss some of their results. They also receive valuable feedback from experienced scientists in this field.

The WIA 2019 has reached a high scientific quality thanks to the preparation and commitment of the PhD students that have participated in it. Additionally, there have been two keynote lectures about the energy of the talents and skills for international activities. They have provided an excellent example to the students on the relevance of top-level scientific knowledge.

These Proceedings summarise the scientific contributions presented and they illustrate the excellent level of the 2019 Workshop, allowing the dissemination of its major achievements.

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

Prof. Pablo Fernández-Escámez PhD

Director of the International Doctoral School- EINDOC

Universidad Politécnica de Cartagena

As Rector of Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT), it is my pleasure and pride to address these words for the Proceedings of the 8th Workshop on Agri-Food Research for young researchers (WIA2019), a consolidated event after its seven previous editions and an important reference in the agri-food research in Europe.

TAIDA is, with no doubt, the main PhD program of our university, with a superb research production in terms of high impact scientific publications and with an important number of PhD awards every year. But, moreover, it is characterized by a strong knowledge transfer to companies of the agri-food sector, that is, the research involved in the thesis is not only theoretical and rigorous, but also practical, with a direct benefit to the society. These two qualities: generation and transfer of knowledge, makes TAIDA a successful program, not only for science growing, but also for science application and employment opportunities to our PhD candidates.

As a socially responsible university, UPCT is committed with Agenda 2030 and its sustainable development goals (SDG). Engineering and engineers can contribute enormously to these goals and, specifically, agri-food engineers and researchers will be a key force for dealing with the superb challenge of feeding an expected global population of 8,600 million in 2030 and 9,800 million in 2050. In this context, WIA2019, as previous editions, was a very useful event for introducing and debating new research lines and works for accomplishing the SDG 2: Zero Hunger and other related SDGs as Responsible Consumption and Production, Climate Action, or Life and Land. These proceedings are a clear proof of the work developed in the last year in our School of Agronomic Engineering and our Institute of Plant Biotechnology for making compatible quality, productivity and sustainability in food production and processing.

I cannot finish these words without thanking the convener of the WIA19, Prof. Francisco Artés-Hernández, and his team for the excellent organization of the workshop and the high quality of the presentations, not only from researchers of our university, but also from other institutions, as CEBAS-CSIC and IMIDA, which are integrated in the TAIDA PhD program. Congratulations to all our PhD candidates and their advisors.

Prof. Alejandro Díaz-Morcillo PhD

Rector, Universidad Politécnica de Cartagena

INDEX

KEYNOTE SPEAKERS

The research career from an integrated and interdisciplinary approach	
F. Pedrero Salcedo*	12
Opportunities of funding for public and business R+D+i. Support by CDTI	
C. Franco Alonso*	13
How an Executive Editor of a scientific journal chooses a manuscript to be reviewed or rejected: main issues to write a good article	
F. Mencarelli*	14

ORAL SESSION I: Food Technology and Engineering

Lower relative differential expression of two genes is associated with delayed ripening in melon	
M. Zarid*, C. Esteras, A.G. Sifres, X. Cañizares, J. Esteva, M.C. Bueso, M.B. Picó, A.J. Monforte, J.P. Fernández Trujillo	16
Quality changes in minimally processed faba bean seeds by using different sanitizing and antibrowning washing solutions	
E. Collado*, F. Artés-Hernández, E. Aguayo, F. Artés, P.A. Gómez	20
Effect of a new rich in bioactive compounds beverage for energetic metabolism modulation in overweight adults	
V. Agulló*, R. Domínguez-Perles, C. García-Viguera	24
New antimicrobial active cardboard packaging to extend the self-life of bulk packaged fresh tomatoes	
L. Buendía-Moreno*, M. Ros-Chumillas, A. López-Gómez	28
Influence of antimicrobial ice on the quality of sea bass (<i>Dicentrarchus labrax</i>) stored at room temperature	
L. Navarro-Segura*, M. Ros-Chumillas, A. López-Gómez	32
Food labeling as a tool of the circular economy	
J.M. Donate-Hernandez*, M.D. de-Miguel	36
Comparison of the FTase activity of extra and intracellular enzymes of fungal origin for the production of scFOS	
M.J. Sánchez-Martínez*, S. Soto-Jover, V. Antolinos-López, A. López-Gómez	40
Effect of the synergy of electric pulses and oregano essential oil in the inactivation of <i>L. monocytogenes</i>	
M. Clemente-Carazo*, A. Garre, V. Sánchez, I. Clemente, S. Condón-Abanto, P.S. Fernández, P.M. Periago, J.G. Lyng	44

ORAL SESSION II: Plant Production Technology and Engineering

Functional and structural soil regeneration in abandoned mine tailings from semiarid Mediterranean areas: relationships with spontaneous plant colonization	
---	--

A. Peñalver-Alcalá*, J. Álvarez-Rogel, M.N. González-Alcaraz.....	49
LED lighting for indoor cultivation of basil	
G. Pennisi*, A. Pistillo, S. Nicola, F. Orsini, G. Gianquinto, J.A. Fernández	53
Carbamates synergize the toxicity of acrinathrin in resistant western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae)	
J. Abellán*, E. Fernández, C. Grávalos, P. Bielza	57
Application of compost tea in the production of baby leaf lettuce in floating trays	
A. Giménez*, J.A. Fernández, C. Egea-Gilabert, J.A. Pascual	61
Influence of methyl jasmonate during white mustard sprouting	
N. Castillejo*, G.B. Martínez-Hernández, F.D. Miranda-Molina, T.V. Klug, P. Gómez, F. Artés, F. Artés-Hernández	65
Evaluation of different crop water status indicators in early flat peach Carioca variety	
A. Temnani Rajjaf*, J.M. De La Rosa, A. Pérez-Pastor	69
Low-Cost infrared thermography for water stress detection in almond trees	
P.J. Blaya-Ros*, R. Torres-Sánchez, V. Blanco-Montoya, R. Domingo	73
Assessment of water status indicators in lime trees	
A.B. Mira-García*, W. Conejero, J. Vera, M.C. Ruíz-Sánchez.....	77
Physiological responses induced by different rootstocks against the infestation of <i>Meloidogyne incognita</i> in a greenhouse pepper crop	
A. Gálvez*, F.M. Del Amor, C. Ros, J. López-Marín	81
ORAL SESSION III: Agrifood Biotechnology	
Silencing of the <i>GIGANTEA1</i> gene in <i>Petunia hybrida</i> affects the vegetative development	
C. Brándoli*, M. Egea Cortines, C. Petri, J. Weiss	86
Silencing Late Elongated Hypocotyl in snapdragon affects scent emission	
M.I. Terry*, M. Egea-Cortines, J. Weiss	90
PepGPFm2, PepDsRed and PepBar, a new generation of viral vectors based on pepino mosaic virus	94
F. Ruiz-Ramón*, R.N. Sempere, F.E. Méndez-López, M.A. Sánchez-Pina, M.A. Aranda	94
A lighting system to increase the early flowering in <i>Fragaria x ananassa</i>	
M.V. Díaz-Galián*, P.J. Navarro Lorente, M. Egea-Cortines	98
Development of loss of function alleles based on CRISPR/CAS9 to study flower and fruit development	102
S. Arbatli*, J. Weiss, M. Egea-Cortines.....	102
Impact of different crop rotation sequences and management practices on soil bacterial diversity in Northern Netherlands	
O. Özbolat*, J. Cuartero, M. Egea, M. Ros, J.A. Pascual, R. Zornoza.....	106
Genetic and environmental effects on the phenotypic structure of <i>Antirrhinum</i>	

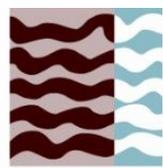
R. Alcantud*, J. Weiss, M. Egea-Cortines.....	110
---	-----

POSTERS SESSION

Denitrification of saline agricultural effluents through woodchips bioreactors in SE Spain	
C. Díaz-García*, J.J. Martínez-Sánchez, J. Álvarez-Rogel.....	115
Assessment of crop diversification public policies	
C. Marín*, J.M. Martínez-Paz, F. Alcón	119
New techniques to improve fertigation efficiency with nitrification inhibitors in lettuce (<i>Lactuca sativa</i> L.) in Murcia	
P. Berríos*, A. Pérez-Pastor, A. Temnani, D. Pérez, I. Gil, M. Forcén, S. Zapata, S. Bañón	123
Enhanced of bioactive compounds in cruciferous sprouts by the use of LED lights	
A. Abellán*, D.A. Moreno, C. García-Viguera.....	127
Assessment of the feasibility of using ozone treated reclaimed salt water for citrus irrigation	
I. Gil-Fernández*, A. Pérez-Pastor	130
Agronomic and physiological evaluation of the use of biostimulants in intensive agriculture	
S. Zapata-García*, P.J. Espinosa-Jimenez, A. Pérez-Pastor	134
Alternatives of preservation and processing to maintain the nutritional properties of broccoli	
E. Paulsen*, P. Lema, D.A. Moreno, P.S. Fernández	137
The importance of native microbial communities in the sustainability of vegetation for the phytomanagement of semiarid mine tailings	
Y. Risueño-García*, C. Petri-Serrano, H.M. Conesa-Alcaraz	141
Design, development and validation of an intelligent system of a decision support system about irrigation water management in agriculture	
M. Forcén*, J.A. López, N. Pavón, A. Pérez.....	145
Characterization of the percentage of badly positioned olives in pitting, slicing and stuffing machines of table olives (DRR)	
A. Lucas Pascual*, A. Madueño Luna, M. de Jodar Lázaro, J.M. Molina Martínez, A. Ruiz Canales	149
Artificial intelligence system for the management of fertigation using weighing lysimetry networks and agronomic sensors	
M. Soler*, J.M. Molina	153
Study of soil microbiota through 'omics' techniques and its bioinformatics and biostatistical analysis in samples of horticultural crop diversification	
J. Cuartero*, M. Ros, J.A. Pascual, J.M. Vivo	156
Improvement of the competitiveness on the sea bass (<i>Argyrosomus regius</i>) sector through genetic selection	
A. Vallecillos*, E. María Dolores, J. Villa, E. Armero	160
Analysis of gene function by CRISPR/Cas9 deletions and transcriptomics	

N. Nmichi*, B. Badaoui, J. Weiss, M. Egea Cortines.....	164
Agroindustrial composts aimed at improving the quality of horticultural crops and inducing resistance to phytopathogens. Study of the biological mechanisms involved	
A. Hernández*, M. Ros, J.A. Pascual	168

Organizers



ETSIA

Escuela Técnica

Superior de

Ingeniería

Agronómica



Instituto Murciano de Investigación y
Desarrollo Agrario y Alimentario

Collaborators



Grupo
G's España



Keynote speakers

The research career from an integrated and interdisciplinary approach

La carrera de investigación desde un enfoque integrado e interdisciplinario

F. Pedrero Salcedo*

Department of Irrigation, CEBAS-CSIC, Campus Universitario de Espinardo, 30100, Murcia, Spain

*fpedrero@cebas.csic.es

Abstract

Nowadays, characteristics as initiative, perseverance, resistance and positive attitude are necessary to be success on the research career. During the initial research period, is developed the research program on reclaimed water use in agriculture, becoming internationally recognized as one of the leading research programs in the field. Dissemination and teaching activities and participation on planning and management tasks on this topic at European level help to acquire maturity and experience. During the last period, is important to be capable to develop planning and management tasks building an outstanding network of international collaborators ranging from academic researchers to Water Regulators to Wastewater technicians, R&D performing engineers of SMEs in agriculture, water treatment and fertigation, R&D Centers researchers, and farmer's groups. Initiatives as main coordinator of the Mediterranean Youth Water network (MedYWat), help to get funding in order to coordinate their own research projects. Finally, the research profile must show an integrated, interdisciplinary and holistic approach to facilitate the application of water reuse inside integrated water management strategy.

Keywords: reclaimed water; irrigation; precision agriculture; nutrient saving; safety risks.

Resumen

Hoy en día, la iniciativa, perseverancia, resistencia y actitud positiva son necesarias para lograr el éxito en la carrera investigadora. Durante la etapa inicial, se desarrolló el programa de investigación sobre el uso del agua regenerada en la agricultura, siendo reconocido internacionalmente como uno de los principales programas de investigación en este campo. Las actividades de difusión y enseñanza y la participación en tareas de planificación y gestión sobre este tema a nivel europeo ayudan a adquirir madurez y experiencia. Durante el último periodo, es importante ser capaz de desarrollar tareas de planificación y gestión en una destacada red de colaboradores internacionales que abarque académicos, administraciones, técnicos de gestión de las aguas residuales, ingenieros de I+D de PYMES en agricultura, tratamiento de agua y fertirrigación, y los grupos de usuarios. Iniciativas como ser el coordinador principal de la red de Jóvenes Profesional del Agua en el Mediterráneo (MedYWat), ayudan a obtener fondos para coordinar los propios proyectos de investigación. Finalmente, el perfil de investigador actual debe mostrar un enfoque integrado, interdisciplinario y holístico para facilitar la aplicación de la reutilización del agua dentro de la estrategia de gestión integrada del agua.

Palabras clave: aguas regeneradas; riego; agricultura de precisión; ahorro de nutrientes; riesgos de seguridad.

Opportunities of funding for public and business R+D+i. Support by CDTI

Oportunidades de financiación a la I+D+i pública y empresarial. Apoyo del CDTI

C. Franco Alonso*

Dirección de Promoción y Coordinación del Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial, Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI), Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Calle del Cid, 4, 28001 Madrid. Spain

*carlos.franco@cdti.es

Abstract

CDTI is a Business Public Entity, depending on the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities. It is the entity that channels applications for funding and support of R+D+i projects of Spanish companies at national and international level. The objective of CDTI is so contribute to the improvement at technological level of Spanish companies and institutions by: i) Technical and economic assessment and funding of R+D projects developed by companies; ii) Management and promotion of the Spanish participation in international research programs; iii) Promotion of the international transfer of technology and the support services to technological innovation; iv) Support of the creation and consolidation of spin-offs. CDTI is the National Contact Point for the EU Framework Programme of R+D+i to conduct research and innovation projects. Furthermore, CDTI supports international cooperation projects, offering funding for innovation and technology transfer projects, multilateral cooperation projects (Eureka and Iberoeka) and bilateral with Canada, Japan, China, South Korea, India and South Africa.

Keywords: research project; technology transfer; spin-off.

Resumen

CDTI es una Entidad Pública Empresarial, dependiente del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. Es la entidad que canaliza las solicitudes de financiación y apoyo a los proyectos de I+D+i de empresas españolas en los ámbitos estatal e internacional. Así pues, el objetivo del CDTI es contribuir a la mejora del nivel tecnológico de las empresas e instituciones españolas mediante el desarrollo de las siguientes actividades: i) Evaluación técnico-económica y financiación de proyectos de I+D desarrollados por empresas; ii) Gestión y promoción de la participación española en programas internacionales de cooperación tecnológica; iii) Promoción de la transferencia internacional de tecnología empresarial y de los servicios de apoyo a la innovación tecnológica; iv) Apoyo a la creación y consolidación de empresas de base tecnológica. El CDTI es punto nacional de contacto del Programa Marco de I+D+i de la UE para la realización de proyectos de investigación y desarrollo. Asimismo, presta apoyo para proyectos de cooperación internacional, para lo que ofrece ayudas a proyectos de innovación y transferencia de tecnología, los proyectos de cooperación multilaterales (Eureka e Iberoeka) y bilaterales con Canadá, Japón, China, Corea del Sur, India y Sudáfrica.

Palabras clave: proyecto de investigación; transferencia tecnológica; empresas de base tecnológica.

How an Executive Editor of a scientific journal chooses a manuscript to be reviewed or rejected: main issues to write a good article

Como un Editor Ejecutivo de una revista elije un trabajo para ser revisado o rechazado: principales claves para escribir un buen trabajo

F. Mencarelli*

Department for the Innovation of Biological, AgriFood and Forest Systems. University of Tuscia. Italy

Executive Editor of the Journal of the Science of Food and Agriculture-JSFA.

*mencarel@unitus.it

Abstract

Submitting a scientific article, which represents the results of a research to a high graded scientific Journal, is always a challenge and anxiety is rising waiting for a positive answer. Unfortunately, about 80% of submitted papers are rejected. The complex work of an Executive Editor is to get a decision: reject or send the manuscript to the revision process. How does he/she decide?. After providing statistics on paper submitted and rejected immediately or after revision in the Journal of the Science of Food and Agriculture –JSFA-, some hints to follow in order to have higher possibility to succeed for publication are given.

Keywords: manuscript; scientific journal; impact factor; publication.

Resumen

El envío de un artículo científico, que representa los resultados de una investigación a una revista científica con elevado índice de impacto, siempre es un desafío y la ansiedad aumenta a la espera de una respuesta positiva. Desafortunadamente, alrededor del 80% de los documentos presentados son rechazados. El complejo trabajo de un Editor Ejecutivo decidir sobre: rechazar el artículo inmediatamente o enviarlo para continuar en el proceso de revisión. ¿Cómo lo decide?. Tras proporcionar las estadísticas sobre trabajos presentados y rechazados inmediatamente o después de la revisión en el Journal of the Science of Food and Agriculture –JSFA-, se dan algunas sugerencias para tener más posibilidades de éxito en la publicación de resultados científicos.

Palabras clave: artículo científico; revista científica; índice de impacto; publicación.

ORAL SESSION I:
Food Technology and
Engineering

Lower relative differential expression of two genes is associated with delayed ripening in melon

Una menor expresión diferencial relativa de dos genes está relacionada con maduración más lenta en melón

M. Zarid^{1*}, C. Esteras², A.G. Sifres², X. Cañizares², J. Esteva¹, M.C. Bueso³, M.B. Picó², A.J. Monforte⁴, J.P. Fernández Trujillo^{1,5}

¹Department of Agronomical Engineering, Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT), Cartagena, Murcia. Spain

²Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad, Universitat Politècnica de Valencia, Valencia. Spain

³Department of Applied Mathematics and Statistics, UPCT, Cartagena, Murcia. Spain

⁴Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) UPV-CSIC, Valencia. Spain

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

*m.zarid@gmail.com

Abstract

The expression of selected genes during ripening was studied considering a melon Near-isogenic Line (NIL) SC10-2 and its parental “Piel de Sapo” (PS). The expression of *CmGGP* (GDP-L-galactose phosphorylase 1), *CmAP2-like X1* (AP2-like ethylene-responsive transcription factor TOE3 isoform X1) and *CmRAP2-11* (ethylene-responsive transcription factor RAP2-11) were differentially expressed in the NIL SC10-2 compared with PS. Consequently, expression of genes that mapped in LG X such as one ethylene response transcription factors or ascorbic acid metabolism gene were probably associated with delayed ripening.

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

Resumen

Con el fin de comparar la expresión génica de un melón cerca de la línea isogénica (NIL) SC10-2 y su parental Piel de Sapo (PS) durante la maduración y para comprender los mecanismos de diferenciación, se realizó una secuenciación transcriptoma. Dos genes de *CmGGP* (GDP-L-galactosa fosforilasa 1) y *CmRAP2-11* (factor de transcripción sensible al etileno RAP2-11) mostraron menor expresión relativa en la NIL SC10 -2 versus PS debido a la introgresión en LG X. Sin embargo, no existieron diferencias en expresión de *CmAP2-like X1* (factor de transcripción sensible al etileno, similar a AP2 TOE3 isoforma X1). En consecuencia, la expresión de genes que mapearon en el grupo de ligamiento X como un factor de transcripción de respuesta a etileno o del metabolismo del ácido ascórbico estuvieron probablemente asociados con el retraso de maduración.

Palabras clave: ARN-seq; calidad de fruto; líneas casi isogénicas; Quantitative Trait Loci (QTLs).

1. INTRODUCTION

Melon (*Cucumis melo* L.) is an important annual diploid plant belonging to the Cucurbitaceae family. Unfortunately, non-climacteric melon fruit ripening and quality have been little studied compared with climacteric melons. *CmGGP* is a GDP-L-galactose phosphorylase 1, *CmAP2-like X1* and *CmRAP2-11* genes are ethylene-responsive transcription factors, which are involved

generally with the other genes in so many important developmental processes and interact with so many plant hormones [1]. The *CmGGP* gene was involved in the ascorbate biosynthetic pathway in plants *Arabidopsis thaliana* [2] and in different fruits such as kiwifruit, strawberry, tomato [3] and probably melon. The *CmGGP*, *CmAP2*-like X1 and *CmRAP2-11* genes which involved in the GDP-D-glucose phosphorylase activity, catalytic activity and glucose metabolic process, and ethylene-responsive transcription factors [4], act directly and/or indirectly on the fruit quality traits. The goal of this paper was to compare the gene expression during melon fruit ripening using the NIL SC10-2 and its parental PS as a model system.

2. MATERIALS AND METHODS

The melon near-isogenic line (*Cucumis melo* L.) SC10-2 was obtained through marker assisted breeding from a cross between a Korean accession "Songwhan Charmi" PI 161375 (SC) and the Spanish cultivar T111 type "Piel de Sapo"(PS) [5]. SC10-2 carries an introgression on linkage group (LG) X from SC into the PS genome. Melon cultivation was under Mediterranean conditions in Torre Pacheco (Murcia, Spain) [6]. Melons were allowed to ripen at 20.5°C and 88% relative humidity during 16 d (n=3). Flesh samples were obtained according to Dos-Santos et al. (2007) and stored at -80°C before freeze drying [7]. Freeze-dried samples for transcriptomic analysis were stored at -25°C. The RNA extraction was performed two times using TRI Reagent RNA isolation protocol. Highly pure total RNA was quantified with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometers (Thermo Scientific, Germany). RNA quality was verified by calculating two absorbance ratios (260/280 nm and 260/230 nm, respectively) and by electrophoresis analysis. The library from DNA free total RNA was constructed following the TruSeq™ Stranded mRNA Sample Preparation kit protocol (Illumina Inc., Redwood, CA, USA) and was sequenced using TruSeq SBS Kit v3-HS, in paired end mode with the read length 2x101bp. The transcriptomic analysis was performed in CNAG (Barcelona) according to the gene sequence reported by Garcia-Mas et al. (2012) [8]. On the other hand, flesh juice mixed with calcium chloride served for aroma volatile extraction by solid phase microextraction and GC-MS analysis for semiquantitative quantification [9]. A two-way ANOVA and a post-hoc Tukey HSD test (p=0.01) with interaction was performed to determine the effects of the pedigree (factor P) and the ripening time (factor t) on the aroma volatiles and gene expression using JMP 5.1 (Systat) and Statgraphics Plus for Windows 2.1 (Statistical Graphics Corp., Herndon, VA, USA).

3. RESULTS AND DISCUSSION

We focus on three genes with differential expression in NIL SC10-2 versus PS (Fig. 1). *CmGGP* gene is a GDP-L-galactose phosphorylase 1 known MELO3C013136, located in CM3.5_scaffold00019 from 883408 to 886606 [10] (Fig. 1), *CmAP2*-like X1 gene is an ethylene-responsive transcription factor RAP2-11 known MELO3C014722, located in CM3.5_scaffold00022 from 5246528 to 5247177 [11] (Fig. 1) and *CmRAP2-11* gene is similar to floral homeotic protein APETALA 2 (*Arabidopsis thaliana*) known MELO3C020848, located in CM3.5_scaffold00045 from 1724235 to 1728074 [12] (Fig. 1). *CmGGP* gene expression showed significantly higher levels in PS than in SC10-2 till 8 d during ripening (Fig. 1). GDP-L-galactose phosphorylase, involved in the ascorbate biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana* [2]. Also, is the only significant source of ascorbate in *A. thaliana* seedlings, and that ascorbate is essential for seedling growth [2]. Moreover, the relative expression of the GGP gene was important for regulation of ascorbic acid (AsA) biosynthesis [13]. Overexpression of kiwifruit or *Arabidopsis* GGP in strawberry, potato and tomato have been shown to significantly increase AsA [3]. The highest increase of ascorbate in tomato fruits reported so far has been about six-fold and was achieved by ectopically expressing GGP from kiwi [13]. There can be several explanations for these differences in fruit development, first the ascorbate increase in strawberry fruit is smaller, thus not being enough to solubilize

pectins, second strawberry is a false fruit with the real fruits (the achenes) located outside the fleshy part, and third the composition of the cell wall surrounding the fruits might be different in terms of pectin composition [14]. *CmAP2*-like X1 gene expression showed similar relative level in both lines during ripening with maximum values at harvest and following a convex trend over time (Fig. 1). Apparently, the gene was downregulated during postharvest ripening but upregulated during melon senescence. On the contrary, the expression of *CmRAP2-11* diminished during ripening but having higher levels in PS than in SC10-2 at harvest and after 8 d (Fig. 1). The transcription of ethylene-regulated genes is mediated by ethylene response factors (ERFs) [16]. The plant hormone ethylene is involved in a wide range of developmental processes and physiological responses such as flowering, fruit ripening, organ senescence, abscission, root nodulation, seed germination, programmed cell death, cell expansion, and responses to abiotic stresses and pathogen attacks [16]. Transcription factors (TFs) like APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTORS (AP2/ERFs) are an integral component of these signalling cascades because they regulate expression of a wide variety of downstream target genes related to stress response and development through different mechanism [17]. AP2/ERF family of TFs are regulated by different plant growth regulators (PGRs) and their role in retrograde signalling. With multiple responses there comes both positive and negative regulation which needs proper concern before generation of recombinant plants [17]. The downstream regulation of transcript does not always positively or beneficially affect the plant but also, they display some developmental defects like senescence and reduced growth under normal condition or sensitivity to stress condition [17]. AP2/ERFs are one of the most important families of TF in plants which regulate various developmental and stress responsive pathways [18, 19].

The introgression of SC10-2 is located in homozygosis in whole LG X [20], and also the gene MELO3C013136 (*CmGGP*), MELO3C014722 (*CmAP2*-like X1) and MELO3C020848 (*CmRAP2-11*) that surely have a contribution delaying ripening of such NIL vs PS [21]. Environmental conditions and preharvest history of each fruit can also affect the gene expression [22].

4. CONCLUSIONS

The expression of two genes were diminished due to the introgression of SC10-2 in the LG X that probably explained the delayed ripening in the NIL.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support: Fundación Séneca de la Región de Murcia (11784/PI/09), MINECO & UE-FEDER funds (AGL2010-20858). Thanks for the technical assistance to P. Varó and his team in CIFEAT-Torre Pacheco (Consejería de Agricultura, Región de Murcia) for crop management and IRTA-CRAG for the seeds of the NIL.

6. REFERENCES

- [1] Danisman, S. (2016). TCP Transcription factors at the interface between environmental challenges and the plant's growth responses. *Front Plant Sci.* 7: 1930.
- [2] Dowdle, J., Ishikawa, T., Gatzek, S., Rolinski, S. (2007). Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *Plant J.* 52:673-89.
- [3] Zhang, B., Liu, C., Wang, Y., Yao, X., Wang, F., Wu, J., King, G.J., Liu, K. (2015). Disruption of a CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 4 gene converts flower colour from white to yellow in Brassica species. *New Phytol.* 206:1513-26.
- [4] www.melonomics.net
- [5] Perpiñá, G., Esteras, C., Gibon, Y., Monforte, A.J., Picó, B. (2016). A new genomic library of melon introgression lines in a cantaloupe genetic background for dissecting desirable agronomical traits *BMC Plant Biol.* 16:154.

- [6] Eduardo I, Arus P., Monforte A.J., (2005) Development of a genomic library of near isogenic lines (NILs) in melon (*Cucumis melo* L.) from the exotic accession PI161375. *Theor Appl Genet* 112: 130-148.
- [7] Dos-Santos, N., Obando, J., Ostos, I., Melgarejo, LM., Moreno, E., Monforte, A.J., Fernández-Trujillo, J.P. (2007). Optimization of the extraction of organic acids in lyophilized melon pulp and analysis by high-performance liquid chromatography. *Proc. IV Ibero-American Virtual Congress of Quality Management in Laboratory*. pp. 203-211.
- [8] Garcia-Mas J, Benjak A., Sanseverino W., Bourgeois M., Mir G., González V. M., Hénaff E., Câmara F., Cozzuto L., Lowy E., Alioto T., Capella-Gutiérrez S., Blanca J., Cañizares J., Ziarsolo P., Gonzalez-Ibeas D., Rodríguez-Moreno L., Droege M., Du L., Alvarez-Tejado M., Lorente-Galdos B., Melé M., Yang L., Weng Y., Navarro A., Marques-Bonet T., Aranda M. A., Nuez F., Picó B., Gabaldón T., Roma G., Guigó R., Casacuberta J. M., Arús P., Puigdomènech P. (2012). The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proc. Nat. Acad Sci.* 109:11872-11877.
- [9] Chaparro-Torres, L.A., Bueso, M.C., Fernández-Trujillo, J.P. (2016). Aroma volatiles at harvest obtained by HSSPME/GC-MS and INDEX/MS-E-nose fingerprint discriminate climacteric behavior in melon fruit. *J. Sci. Food Agric.* 96: 2352-2365.
- [10] <http://melonomics.cragenomica.es/feature/MELO3C013136/>
- [11] <http://melonomics.cragenomica.es/feature/MELO3C014722/>
- [12] <http://melonomics.cragenomica.es/feature/MELO3C020848/>
- [13] Jiang, Z.Y., Zhong, Y., Zheng, J., Ali, M., Liu, G.D., Zheng, X.L. (2018). L-ascorbic acid metabolism in an ascorbate-rich kiwifruit (*Actinidia eriantha* Benth.) cv. 'White' during postharvest. *Plant Physiol. Biochem.* 124:20-28.
- [14] Bulley, S., Wright, M., Rommens, C., Yan, H., Rassam, M., Lin-Wang, K. (2012). Enhancing ascorbate in fruits and tubers through over-expression of the L-galactose pathway gene GDP-L-galactose phosphorylase. *Plant Biotechnol. J.* 10: 390-397.
- [15] Fenech, M., Amaya, I., Valpuesta, V., Botella, M.A. (2019). Vitamin C content in fruits: Biosynthesis and regulation. *Front. Plant Sci.* 9: 2006. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.02006>
- [16] Liu, M., Gomes, B. L., Mila, I., Purgatto, E., Peres, L.E.P., Frasse, P., Maza, E., Zouine, M., Roustan, J.P, Bouzayen, M., Pirrello, J. (2016). Comprehensive profiling of ethylene response factor expression identifies ripening-associated ERF genes and their link to key regulators of fruit ripening in tomato. *Plant Physiol.* 170: 1732-1744.
- [17] Ujjal J.P., Gajendra S.J., Vineeta T., Rakesh K.S. (2017). Regulation of Apetala2/Ethylene Response Factors in Plants. *Front. Plant Sci.* 8:150. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00150>
- [18] Licausi, F., Ohme-Takagi, M., and Perata, P. (2013). APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs. *New Phytol.* 199: 639-649.
- [19] Li, M. Y., Xu, Z. S., Huang, Y., Tian, C., Wang, F., and Xiong, A. S. (2015). Genome-wide analysis of AP2/ERF transcription factors in carrot (*Daucus carota* L.) reveals evolution and expression profiles under abiotic stress. *Mol. Genet. Genomics* 290, 2049-2061.
- [20] Escudero, A.A., Zarid, M., Bueso, M.C., Fernández-Trujillo, J.P. (2018). Aroma volatiles during non-climacteric melon ripening and potential association with flesh firmness. *Acta Hort.* 1194:363-366.
- [21] Dos-Santos, N., Bueso, M., Fernández-Trujillo, J.P. (2013). Aroma volatiles as biomarkers of textural differences at harvest in non-climacteric near-isogenic lines of melon. *Food Res. Intl.* 54: 1801-1812.
- [22] Zarid, M., Fernández-Trujillo, J.P. (2016). Seasonal effect on selected quality traits of a melon near-isogenic line. *En: Proc. 5th Workshop Agri-Food Res.* Eds.: F. Artés-Hernández, M. Egea-Cortines, J.A. Fernández-Hernández, J. Calatrava, E. Aguayo, J.J. Alarcón, J.E. Cos. Ed.: CRAI Biblioteca. Universidad Politécnica de Cartagena, pp. 44-47.

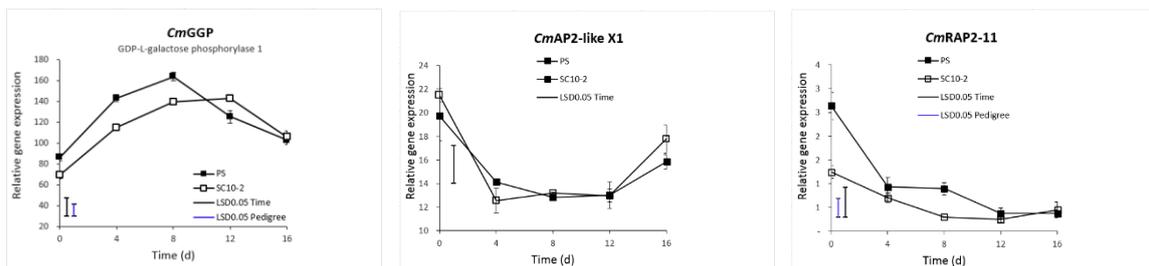


Figure 1. Relative gene expression of the NIL SC10-2 and its parental control PS during ripening at 20.5°C and 88% relative humidity (mean ± SE, n=3). **CmGGP**: GDP-L-galactose phosphorylase 1 / **CmAP2-like X1**: AP2-like ethylene-responsive transcription factor TOE3 isoform X1 / **CmRAP2-11**: ethylene-responsive transcription factor RAP2-11.

Quality changes in minimally processed faba bean seeds by using different sanitizing and antibrowning washing solutions

Cambios en la calidad de semillas de haba mínimamente procesadas mediante el uso de diferentes soluciones desinfectantes y antipardeantes

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

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

²Postharvest and Refrigeration Group. Department of Agronomical Engineering. Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203. Cartagena. Spain

*elenacolladomarin@hotmail.com

Abstract

Faba beans seeds (*Vicia faba*) are an important source of protein, carbohydrates, minerals and bioactive compounds with antioxidant activity. In this sense, fresh faba seeds as a fresh-cut or minimally processed product can stimulate the consumption of legumes and it would help to the prevention and control of chronic diseases. The present study evaluated the effect of different sanitizers (NaOCl, 150 ppm, pH 6.5) or alternatively acidified sodium chlorite (ASC, 300 ppm, pH 1.8), chlorine plus citric acid (NaOCl+CA, 0.05 g/mol) and ASC plus citric acid (ASC+CA, 0.05 g/mol) on quality changes of fresh-cut faba seeds stored up to 10 days at 4°C. Evolution of total phenolics content and antioxidant capacity were studied. At the end of storage, a significant decrease in total phenolics and antioxidant capacity was observed for NaOCl treated seeds regarding the remaining treatments.

Keywords: *Vicia faba*; fresh-cut; NaOCl; sodium chlorite; citric acid.

Resumen

Las habas (*Vicia faba*) son una fuente importante de proteínas, carbohidratos, minerales y compuestos bioactivos con actividad antioxidante. En este sentido, la producción de semillas frescas de haba como producto mínimamente procesado pueden estimular el consumo de legumbres, lo que ayudaría a la prevención y control de ciertas enfermedades crónicas. El presente estudio evaluó el efecto de diferentes desinfectantes (NaOCl, 150 ppm, pH 6,5) o alternativamente clorito sódico acidificado (ASC, 300 ppm, pH 1,8), NaOCl + ácido cítrico (NaOCl+CA, 0,05 g/mol) y clorito sódico acidificado + ácido cítrico (ASC+CA, 0,05 g/mol) sobre los cambios en la calidad de las semillas frescas de haba almacenadas durante 10 días a 4°C. Para ello, se estudió la evolución del contenido en compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante total. Tras la vida útil, se observó una disminución del contenido en fenoles totales y en la capacidad antioxidante para el tratamiento con NaOCl en comparación con el resto.

Palabras clave: *Vicia faba*; 4^a Gama; NaOCl; clorito sódico acidificado; ácido cítrico.

1. INTRODUCCIÓN

Las legumbres son una excelente fuente de numerosos nutrientes esenciales y son bajas en calorías y grasas. Se consideran nutricionalmente recomendadas y deben consumirse como parte de una dieta saludable para combatir la obesidad y prevenir enfermedades como la diabetes, alteraciones cardíacas y el cáncer [1,2]. Para fomentar el consumo de legumbres, una de las soluciones que se plantean es el desarrollo de productos mínimamente procesados o de la IV gama, listos para consumir.

Para la desinfección de productos de IV gama, la industria utiliza generalmente el hipoclorito de sodio (NaOCl) por su efectividad antimicrobiana, facilidad de utilización y su bajo coste [3]. Sin embargo, es cuestionado debido a la formación de subproductos tóxicos. Como alternativa al NaOCl, otros desinfectantes, como el clorito sódico acidificado (ASC) o el ácido cítrico (CA) se han utilizado en gran medida para la prevención del pardeamiento enzimático y no enzimático [4].

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del lavado con NaOCl (100 ppm, pH 6,5) o alternativamente con clorito sódico acidificado (ASC, 300 ppm, pH 1,8), NaOCl más ácido cítrico (NaOCl+CA, 0,05 g/mol) y clorito sódico acidificado más ácido cítrico (ASC+CA, 0,05 g/mol) durante 10 días a 4°C, sobre el contenido en compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante total de semillas de habas mínimamente procesadas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Procesado, envasado y conservación

El material vegetal (habas variedad “Palenca”) se recolectó en el mes de marzo. Las muestras fueron transportadas bajo condiciones de refrigeración al laboratorio, manteniéndolas en oscuridad a 4°C y 90-95% de humedad relativa. Al día siguiente las habas se pelaron manualmente en una sala desinfectada y climatizada a 8°C y se aplicaron los distintos tratamientos de desinfección. Las semillas de habas se sumergieron durante 2 min en los distintos desinfectantes: (1) NaOCl (150 mg L⁻¹, pH 6,5); (2) ASC (300 mg L⁻¹, pH 1,8); (3) NaOCl (150 mg L⁻¹) + CA (0,05 g/mol); (4) ASC (300 mg L⁻¹, pH 1,8) + CA (0,05 g mol⁻¹), para posteriormente realizar un enjuague con agua fría durante 1 min. Se envasaron 125 g en bolsas (15x15 cm) de OPP (35 µm de espesor). Una vez termoselladas se almacenaron a 4°C. Se prepararon 5 repeticiones por tratamiento y día de evaluación.

2.2 Contenido en compuestos fenólicos totales

El contenido en polifenoles totales (TPC) fue analizado según el método de Singleton y Rossi (1965) [5] con algunas modificaciones. Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de ácido gálico por 100 g⁻¹ pf. Se analizaron 3 réplicas por tratamiento y temperatura.

2.3 Capacidad antioxidante total

La capacidad antioxidante total (TEAC) fue analizada por el método FRAP [6]. Los resultados fueron expresados en mg trolox 100 g⁻¹ pf. Se analizaron 3 réplicas por tratamiento y temperatura.

2.4 Análisis estadístico

El análisis de varianza (ANOVA) se realizó comparando los diferentes tratamientos, tiempo de almacenamiento y temperatura de conservación a un nivel significativo de $P \leq 0,05$ utilizando PASW Statistics 23 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La atmósfera modificada de equilibrio en el interior de los envases fue de 15-18 kPa de presión parcial de CO₂, y entre 3-6 kPa de presión parcial de O₂, sin diferencias significativas entre los tratamientos durante el almacenamiento.

3.1 Compuestos fenólicos totales

Los compuestos fenólicos están relacionados con la calidad sensorial de las frutas y hortalizas, ya que su oxidación provoca un oscurecimiento enzimático en los alimentos. Por otro lado, son responsables de cierta actividad antioxidante. El TPC de las muestras de NaOCl (64,35±5,39 mg GAE 100 g⁻¹ pf) fue ligeramente superior al contenido previamente reportado por Saini et al. (2016) [6] en semillas inmaduras de habas (56,5±8,50 mg GAE 100 g⁻¹ pf) e inferior al contenido reportado por Boukhenouf et al. (2016) [7] también para semillas de haba (120±1,90 mg GAE 100 g⁻¹ pf). Esto puede atribuirse a factores genéticos y condiciones ambientales que influirían en la concentración de TPC en las hortalizas. El TPC fue similar para las semillas de ASC, NaOCl+ CA y ASC + CA en el día de procesamiento, mostrando diferencias significativas con el tratamiento con NaOCl, que presentó un contenido de fenoles 40% inferior con respecto a todos los demás tratamientos (Figura 1). A partir de ese día, se observó una disminución de la concentración de fenoles hasta el final del almacenamiento de 21,5%, 27%, 22% y 24% para NaOCl, ASC, NaOCl + CA y ASC + CA, respectivamente.

3.2 Capacidad antioxidante total

El TEAC evaluado por el ensayo FRAP se presenta en la Figura 2. Los valores iniciales de TEAC fueron 229,63±1,90, 340,58±41,36, 309,40±41,42 y 305,04±33,26 mg TEAC kg⁻¹ pf para NaOCl, ASC, NaOCl+CA y ASC+CA, respectivamente (Figura 2). Al final del almacenamiento (día 13), se observó una disminución de alrededor del 25% para todos los tratamientos, sin diferencias significativas entre ellos, pero sí respecto al tratamiento con NaOCl.

La capacidad antioxidante retenida observada en nuestro estudio podría atribuirse al mantenimiento de la concentración de fenoles totales. Anteriormente se ha reportado una disminución en la actividad antioxidante de las semillas frescas de guisantes [8] a lo largo de la vida útil. Los valores obtenidos en capacidad antioxidante son inferiores a los que se encuentran en la literatura [7,9] pero de nuevo, podría estar relacionado con el genotipo.

4. CONCLUSIONES

El uso de clorito sódico acidificado y de ácido cítrico podría ser una alternativa a la utilización de NaOCl, ya que se obtienen mejores resultados de preservación de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante total. Son tratamientos asequibles que pueden ser fácilmente aplicados por la industria, evitando el uso del NaOCl y, en consecuencia, sus efectos secundarios negativos.

5. AGRADECIMIENTOS

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

6. REFERENCIAS

[1] Bouchenak, M., and Myriem, L.S. (2013). Nutritional quality of legumes, and their role in cardiometabolic risk prevention: A Review. Journal of medicinal food. 16.

- [2] Singh, B., Singh, Jatinder, P., Shevkani, K., Singh, N., and Kaur, A. (2017). Bioactive constituents in pulses and their health benefits. *Journal of Food Science and Technology*. 54: 1-13.
- [3] Artés F., Gómez P., Aguayo E., Escalona V., Artés-Hernández F. 2009. Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. *Postharvest Biol. Technol.* 51: 287-296.
- [4] Sapers, G. (1993). Scientific status summary browning of foods: control by sulphites, antioxidants and other means. *Food Technology*. 47: 75-84.
- [5] Singleton V.L., Rossi J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. *J. Enol. Vitic.* 16: 144-158.
- [6] Benzie I.F., Strain J.J. 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* 299: 15-27.
- [6] Saini, P., Singh, P., Dubey, S., and Srivastava, A. (2016). Effect of different processing methods on polyphenolic content and antioxidant activity of broad beans (*Vicia faba*). *International journal of Critical Research and Review*. 8: 6-11.
- [7] Boukhenouf, S., Louaileche, H., and Perrin, D. (2016). Phytochemical content and in vitro antioxidant activity of faba bean (*Vicia faba* L.) as affected by maturity stage and cooking practice. *International Food Research Journal*. 23(3): 954-961.
- [8] Collado, E., Venzke Klug, T., Martínez-Sánchez, A., Artés-Hernández, F., Aguayo, E., Artés, F., Fernández, J.A., and Gómez, P.A. (2017). Immature pea seeds. Effect of storage under modified atmosphere packaging and sanitation with acidified sodium chlorite. *Journal of Science of Food Agriculture*.
- [9] Kwon, S.J., Kim, D.G., Kim, J.M., Kang, K.Y., Lee, M.K., Hong, M.J., Kim, J.B., Eom, S.H., Kang, S.Y., Ha, B.K., and Ryu J. (2018). Phytochemical Compounds and Antioxidant Activity in the Grain of Selected Faba Bean (*Vicia faba*) Genotypes. *Plant Breeding and Biotechnology*. 6(1): 65-73.

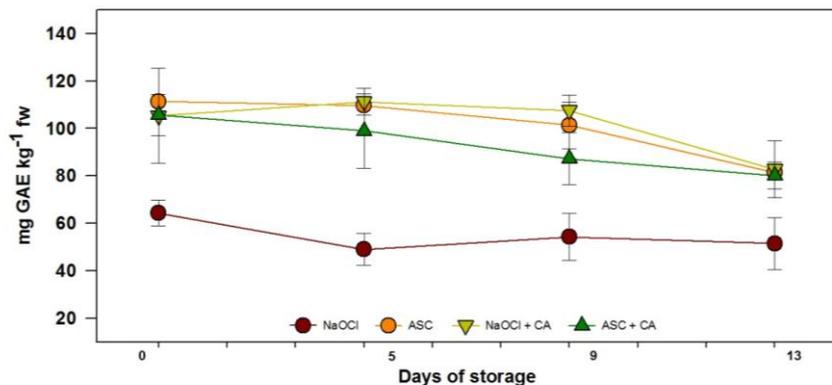


Figura 1. Evolución del contenido en fenoles totales en habas frescas tratadas con diferentes desinfectantes y antipardeantes (NaOCl: hipoclorito sódico; ASC: clorito sódico acidificado; CA: ácido cítrico) almacenadas en atmósfera modificada a 4°C (n=3±SD).

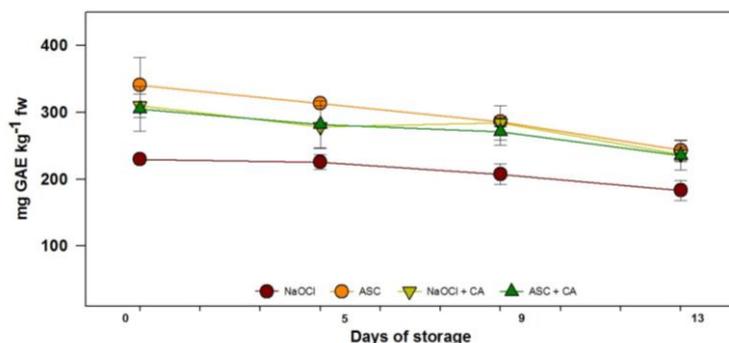


Figura 2. Evolución del contenido en capacidad antioxidante en habas frescas tratadas con diferentes desinfectantes y antipardeantes (NaOCl: hipoclorito sódico; ASC: clorito sódico acidificado; CA: ácido cítrico) almacenadas en atmósfera modificada a 4°C (n=3±SD).

Effect of a new rich in bioactive compounds beverage for energetic metabolism modulation in overweight adults

Efecto de una nueva bebida rica en compuestos bioactivos para modular el metabolismo energético en adultos con sobrepeso

V. Agulló*, R. Domínguez-Perles, C. García-Viguera

Laboratorio de Fitoquímica y Alimentos Saludables, Dpto Ciencia y Tecnología de Alimentos, CEBAS-CSIC. Campus Universitario de Espinardo 25, Murcia. Spain

*vagullo@cebas.csic.es

Abstract

In recent decades, a positive relationship has been demonstrated between the consumption of sugary drinks and the risk of obesity, diabetes and cardiovascular diseases. To reduce the sugar content of foods while maintaining a pleasant taste, new options have been proposed using sweeteners, although it is questioned whether these additives contribute to a higher caloric intake or if they produce negative long-term effects. In addition, to promote the consumption of fruits and vegetables, new formulations that increase the shelf life of fresh fruits, preserve nutrients and reduce the energy content of fruit juices are being developed. The research will begin with the development of citrus-based and maqui-based beverages, rich in bioactive (poly) phenolic compounds, which include non-nutritive natural sweeteners (stevia). The project will cover everything from food technological development to fitochemical characterization of the beverages in terms of anthocyanins.

Keywords: juice; phenolic compound; stevia; anthocyanin.

Resumen

En las últimas décadas se ha demostrado una relación positiva entre el consumo de bebidas azucaradas y el riesgo de obesidad, diabetes y enfermedades cardiovasculares. Para reducir el contenido en azúcares de los alimentos manteniendo un sabor agradable, se han propuesto nuevas opciones usando edulcorantes, aunque se cuestiona si dichos aditivos contribuyen a una mayor ingesta calórica o si producen efectos negativos a largo plazo. Además, para fomentar el consumo de frutas y hortalizas se están desarrollando nuevas formulaciones que aumenten la vida útil de las frutas frescas, preserven los nutrientes y reduzcan el contenido energético de los zumos de frutas. La investigación comenzará con el desarrollo de bebidas a base cítricos y maqui, ricas en compuestos bioactivos (poli) fenólicos, que incluyan edulcorantes no nutritivos de tipo natural (estevia). El estudio abarcará desde el desarrollo tecnológico alimentario hasta la caracterización fitoquímica de las bebidas en términos de antocianos.

Palabras clave: zumo; compuesto fenólico; estevia; antociano.

1. INTRODUCCIÓN

Grandes estudios epidemiológicos han demostrado una relación positiva entre el consumo de bebidas azucaradas y el riesgo de obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares y el síndrome metabólico [1, 2]. Este tipo de bebidas, elaboradas generalmente con sacarosa y jarabe de fructosa, son fuentes de azúcares rápidamente absorbibles que producen un aumento rápido en plasma de la glucosa y la insulina tras su ingesta, lo que contribuye a producir resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa.

Paralelamente a la búsqueda de alternativas saludables al alto consumo de bebidas azucaradas, existe una necesidad importante de aumentar el consumo de frutas y verduras en la población y desarrollar nuevas formulaciones que aumenten la vida útil de las frutas frescas, preserven los nutrientes o reduzcan el contenido energético de los zumos de frutas. En este sentido, el limón, con su agradable aroma y su alto valor nutritivo es una apuesta importante en la elaboración de bebidas no alcohólicas [3]. Otro ingrediente novedoso y de atractivas propiedades es el maqui (*Aristotelia chilensis*), una fuente natural especialmente rica en antocianos (derivados de cianidina y delphinidina) y también contiene ácidos hidroxycinámicos (clorogénico) [4]. Se ha observado que los antocianos mejoran la hiperglicemia y la sensibilidad a la insulina vía activación de rutas de señalización celular [5].

Con el fin de reducir el contenido en azúcares hay una tendencia a buscar otras opciones a través de edulcorantes añadidos, aunque existe cierta polémica en relación a ellos ya que parece ser que contribuyen a una mayor ingesta calórica y a la obesidad [6]. Por ello emplearemos edulcorantes de tipo natural (estevia), en comparación con una bebida tradicionalmente elaborada con fructosa/sacarosa.

Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo es estudiar la influencia de diversos edulcorantes, empleados en la elaboración de una nueva bebida, rica en compuestos bioactivos (polifenoles y vitaminas), sobre los antocianos de la misma con el fin de encontrar alternativas saludables al consumo de azúcares.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Compuestos químicos

La cianidina 3-O-glucosido ($\geq 98\%$ pureza) se obtuvo de TransMIT (Geiben, Alemania). Otros agentes químicos fueron ácido fórmico 98% y metanol, obtenidos de PanReac (Barcelona, España). Todas las disoluciones se prepararon con agua ultrapura de un sistema de purificación de agua ultrapura Milli-Q Advantage A10 (Millipore, EEUU).

2.2. Frutas y edulcorantes

Se obtuvo maqui orgánico en polvo de la empresa Maqui New Life S.A. (Santiago, Chile). Cítricos de Murcia S.L. (Ceutí, España) y AMC Grupo Alimentación Fresco y Zumos S.A. (Espinardo, España) proporcionaron los zumos de cítricos. La sacarosa se obtuvo de AB Azucarera Iberia S.L. (Madrid, España) y la estevia, de Agristevia (Molina del Segura, España).

2.3. Diseño experimental

El polvo de maqui se mezcló con el zumo de cítricos para obtener la base de la bebida. Posteriormente, a dicho producto se adicionaron los dos edulcorantes con el fin de obtener dos bebidas diferentes. Para finalizar, se aplicó un tratamiento térmico de pasteurización suave a las bebidas.

Las bebidas se almacenaron en botellas transparentes de 330 mL, a 5°C y 25°C en oscuridad durante 90 días. Cada análisis se realizó por triplicado, y se llevaron a cabo cada 15 días durante 60 días, y el último análisis se realizó el día 90.

2.4. Identificación y cuantificación de antocianos

Todas las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 10,500 rpm (model Sigma 1-13, B. Braun Biotech International, Osterode, Alemania). El sobrenadante se filtró por una membrana PVDF (Millex HV13, Millipore, Bedford, Mass., EEUU) antes de su inyección en el sistema HPLC. Para la identificación y cuantificación se utilizó el método anteriormente descrito por Gironés-Vilaplana et. al. [3] con algunas modificaciones. Las muestras se analizaron en un equipo de cromatografía líquida Agilent Technologies 1220 Infinity, equipado con un detector de diodo array Agilent Technologies 1260 y un autoinyector Agilent Technologies G1313 (California, EEUU). Los resultados se procesaron en el software Agilent ChemStation for LC 3D systems.

Los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como la media de los valores. Los antocianos se cuantificaron por comparación de absorbancias de las áreas bajo la curva de los correspondientes picos del cromatograma frente a la de los estándares analíticos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación y cuantificación de antocianos

Se identificaron mediante HPLC-DAD los antocianos individuales presentes en la bebida [Fig. 1], y se ha corroborado con los antocianos descritos en *A. chilensis* anteriormente [4]. El porcentaje inicial de cada uno de los antocianos individuales fue similar tanto para estevia como para sacarosa, al igual que el contenido total inicial, $21,18 \pm 0,01$ mg/100mL para estevia y $22,20 \pm 0,01$ mg/100mL para sacarosa.

El contenido de antocianos tiende a disminuir a 25°C para los dos edulcorantes (Fig. 2). Sin embargo, esta disminución es menor a 5°C (Fig. 3), siendo los porcentajes de pérdida de un 92% y de un 41%, respectivamente.

Estos datos confirman que la degradación de antocianos es menor a bajas temperaturas de almacenamiento frente a temperaturas más elevadas [7]. Además, no se aprecian diferencias significativas entre ambos edulcorantes y su influencia sobre los antocianos, siendo un resultado positivo para el objetivo propuesto.

4. CONCLUSIONES

Las bebidas elaboradas presentan un alto contenido en antocianos, compuestos bioactivos con propiedades muy beneficiosas para la salud [5]. Además, la estevia muestra un comportamiento similar a la sacarosa en cuanto a estos compuestos se refiere, por lo que este edulcorante puede ser una alternativa real a la sacarosa, favoreciendo de esta manera la disminución en la ingesta de azúcares.

5. AGRADECIMIENTOS

Colaboración y asesoramiento técnico a escala semi-industrial de la Dra Martí (UMH) y financiación del proyecto coordinado AGL2016-75332-C2-1-R.

6. REFERENCIAS

- [1] Hu, F.B., V.S. Malik, 2010. Sugar-sweetened beverages and risk of obesity and type 2 diabetes: epidemiologic evidence. *Physiol Behav.* 100:47-54.
- [2] Popkin B.M., 2012. Sugary beverages represent a threat to global health. *Trends Endocrinol Metab.* 23(12):591-3.

[3] Gonzalez-Molina E., Domínguez-Perles R., Moreno D. A., García-Viguera C. 2010. Natural bioactive compounds of Citrus limon for food and health. *NJ Pharm Biomed Anal.* 51: 327-345.

[4] Gironés-Vilaplana A., Baenas N., Villaño D., Speisky H., Garcia-Viguera C.; Moreno D.A. 2014. Evaluation of Latin-American fruits rich in phytochemicals with biological effects. *J Func Foods.* 7:599-608.

[5] Hanhineva K., Törrönen R., Bondia-Pons I., Pekkinen J., Kolehmainen M., Mykkänen H., Poutanen K., 2010. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int J Mol Sci.* 11(4):1365-402.

[6] Suez J., Korem T., Zeevi D., Zilberman-Schapira G., Thaiss C.A., Maza O., Israeli D., Zmora N., Gilad S., Weinberger A., Kuperman Y., Harmelin A., Kolodkin-Gal I., Shapiro H., Halpern Z., Segal E., Elinav E., 2014. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature.* 514(7521):181-6.

[7] Fracassetti D., Del Bo' C., Simonetti P., Gardana C., Klimis-Zacas D., Ciappellano S. 2013. Effect of Time and Storage Temperature on Anthocyanin Decay and Antioxidant Activity in Wild Blueberry (*Vaccinium angustifolium*) Powder. *J Agric Food Chem.* 61 (12), 2999-3005.

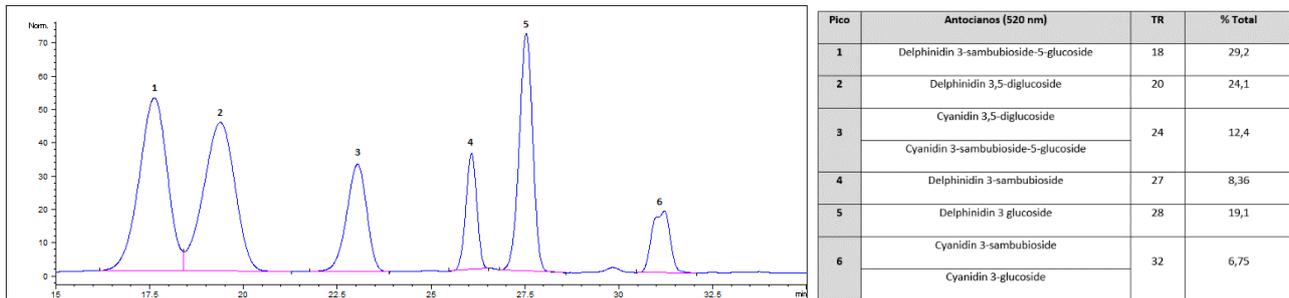


Fig. 1. Antocianos individuales de las bebidas y su porcentaje respecto al contenido total.

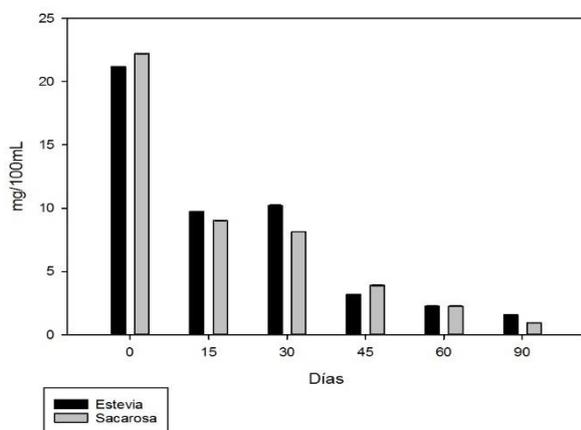


Fig. 2. Contenido total de antocianos de las bebidas durante 90 días de almacenamiento a 25°C.

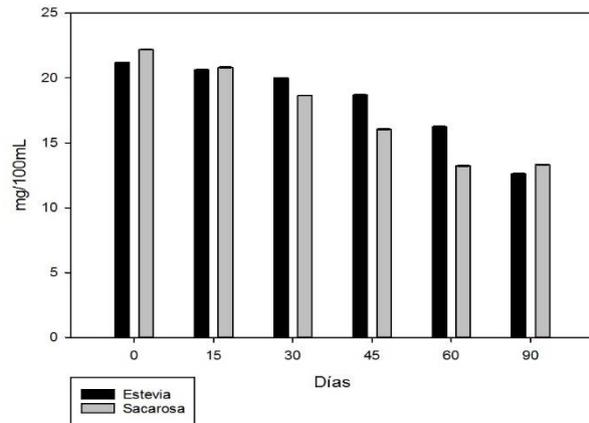


Fig. 3. Contenido total de antocianos de las bebidas durante 90 días de almacenamiento a 5°C.

New antimicrobial active cardboard packaging to extend the self-life of bulk packaged fresh tomatoes

Nueva caja de cartón activa antimicrobiana para alargar la vida útil de tomates frescos envasados a granel

L. Buendía-Moreno*, M. Ros-Chumillas, A. López-Gómez

Department of Agronomical Engineering, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, 30203 Cartagena. Spain

*laura.buendia.moreno@gmail.com

Abstract

The cardboard packaging is very accepted due to its sustainability nature. In addition, cardboard trays are used for the bulk packaging of most fresh fruits and vegetables marketed for export. In these cases, but also in the national market, it is very important that the product remain in optimum quality conditions during its shelf life. Conventional cardboard trays do not interact with the product to extend its shelf life. Therefore, in many cases, the product arrives at the destination market with certain defects of rot. This paper proposes an active cardboard box solution for bulk packaging of fresh tomatoes, which differs from other proposals of cardboard active packaging that have not been successful in the market. This cardboard active tray proposal has a water-based acrylic emulsion coating that includes nanoencapsulated essential oils in β -cyclodextrins (β -CD). In this study, the influence of this type of active packaging on the shelf life and quality (physical-chemical and sensory, and surface microbiology) of fresh tomato packed in bulk, compared to the conventional carton, has been performed.

Keywords: β -Cyclodextrins; essential oils; shelf life; fresh vegetables.

Resumen

El envase de cartón es muy aceptado por su carácter sostenible. Además, las cajas de cartón se utilizan para el envasado a granel de la mayor parte de frutas y hortalizas comercializadas que se destinan a exportación. En estos casos, también en el mercado nacional, es muy importante que el producto se mantenga en óptimas condiciones de calidad durante su vida útil. Los envases de cartón convencionales no interactúan con el producto para alargar su vida útil. Por ello, en muchos casos, el producto llega al mercado de destino con ciertos defectos de podredumbre. En este trabajo se propone una solución de caja activa de cartón para el envasado a granel de tomates, que se diferencia de otras propuestas para este tipo de envase activo de cartón que no han tenido éxito en el mercado. Esta propuesta de caja activa de cartón posee un recubrimiento acrílico en base agua que incluye aceites esenciales nanoencapsulados en β -ciclodextrinas (β -CD). En este trabajo se presenta un estudio de la influencia de este tipo de envase activo sobre la vida útil y la calidad (físico-química y sensorial, y microbiología superficial) del tomate envasado a granel, en comparación con el envase de cartón convencional.

Palabras clave: β -Ciclodextrinas; aceites esenciales; vida útil; verduras frescas.

1. INTRODUCCIÓN

España es uno de los principales países productores y exportadores hortofrutícolas, siendo la Región de Murcia uno de los mayores productores de tomate fresco [1]. Este sector se enfrenta a otros países productores que en algunos casos consiguen precios de venta más bajos, aunque la calidad sea ligeramente inferior. Por ello, es importante avanzar en la tecnología de envasado y conservación del tomate, para diferenciar todavía más la calidad y la vida útil de los productos frescos españoles.

En los últimos años existe una tendencia en usar envases biodegradables para reducir el impacto medioambiental. Es por ello que el uso de envases de cartón está en auge debido en parte a que tiene también unas propiedades mecánicas que se adaptan muy bien a los envases que se necesitan para la conservación y transporte de frutas y hortalizas frescas. Pero los envases de cartón (bandejas) utilizados actualmente, sin propiedades activas, no permiten extender mucho la vida útil ni asegurar todavía más la no presencia de microorganismos patógenos en estos productos [2].

Por ello, se propone una solución tecnológica de envase activo de cartón, basada en la utilización de un recubrimiento sobre el cartón que incluye aceites esenciales (AE) nanoencapsulados en β -ciclodextrinas (β -CD), como agentes activos antimicrobianos, disueltos en la emulsión en base agua de un polímero acrílico que se utiliza para conseguir una cierta resistencia a la humedad del cartón. El uso de estos complejos de inclusión (AEs+ β -CD) permite que los AEs no se evaporen durante el secado industrial en el proceso de fabricación del cartón, ni durante el almacenamiento del cartón hasta su uso. Cuando las frutas y hortalizas están envasadas en este tipo de caja activa y se almacenan a bajas temperaturas y elevada humedad relativa (HR), estos aceites son liberados como vapores que ejercen una acción antimicrobiana sobre los microorganismos presentes en la superficie de estos productos hortofrutícolas [3].

Con este trabajo se pretende validar a escala industrial el prototipo de este envase activo de cartón desarrollado en el envasado a granel de tomates frescos. Para ello, se ha realizado un estudio comparativo de la vida útil y la calidad (mediante análisis microbiológicos, físico-químicos y sensoriales) de tomates conservados en cajas activas de cartón y en cajas convencionales.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Preparación del envase multiactivo

La mezcla de AEs encapsulados en β -CD utilizada está compuesta por carvacrol, canela, y orégano (con proporción 70:20:10 en peso). La nanoencapsulación de los AEs, o formación del complejo de inclusión (AEs+ β -CD) se realizó mediante el método del amasado (mezcla equimolar; 1 g de AEa se mezcla con 7,6 g de β -CD) [3]. El agente activo (complejo AEs+ β -CD) fue disuelto en una emulsión de polimérico acrílico alcanzando una concentración total de sólidos solubles del 30%. Esta emulsión fue aplicada a nivel industrial en la capa de papel interna de la plancha de cartón, a razón del 4 mL/m² de plancha, obteniendo un nivel de sólidos activos en la superficie de la caja activa de 1 g/m². Con las planchas fabricadas, se formaron cajas activas de cartón de dimensiones 400 x 300 x 90 mm, para el envasado a granel de tomates frescos.

2.2 Material vegetal y condiciones de estudio

El tomate fresco utilizado en este trabajo fue de la variedad híbrida Caniles, suministrado por la empresa Agrícola Aguileña S.A. (Águilas, Murcia). Las soluciones de envasado estudiadas fueron las siguientes: Caja Control, de cartón tradicional, y Caja Activa, de cartón que incluye los agentes activos descritos anteriormente. Ambos tipos de caja de cartón o bandeja de cartón tenían la misma geometría y dimensiones.

2.3 Condiciones de conservación de los tomates envasados a granel en cajas de cartón

Los tomates se envasaron en línea industrial después de su lavado, para formar a continuación un palet con cada tipo de caja (con 60 cajas / palet). Después, se almacenaron en cámara frigorífica industrial a 8°C y 85% HR.

2.4 Evolución de la calidad de los tomates a lo largo de su conservación refrigerada.

Durante su conservación refrigerada se realizaron diferentes muestreos, en los días 0, 6, 11 y 22. Para ello, se tomaron tres cajas enteras de cartón de cada tipo, en cada muestreo, seleccionadas al azar en diferentes niveles del palet, y se analizó la evolución de la calidad microbiológica, análisis físico-químico y sensorial a lo largo de su conservación.

Para la microbiología superficial del tomate, se estudió la flora total de microorganismos mesófilos, enterobacterias, psicrófilos y mohos. Paralelamente, se realizó un recuento de podridos (determinados como el porcentaje de frutos podridos respecto del total de frutos de la caja entera), en cada tipo de caja de cartón.

El análisis de firmeza se realizó mediante un texturómetro TAXT plus de TA Instrument (Stable Micro System) con una sonda P4 de 4 mm de diámetro penetrando la piel de la zona ecuatorial del tomate fresco [4]. Para finalizar, el análisis sensorial se realizó utilizando una ficha de cata con una escala hedónica del 1 al 10 para cada atributo estudiado, siendo 1 la peor valoración y 10 la mejor.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el análisis microbiológico mostraron un recuento de enterobacterias inferior en los tomates conservados en las cajas activas en los días 6 y 12, posteriormente no se observaron diferencias significativas (Fig. 1). Los recuentos obtenidos para mohos son menores en los frutos conservados en caja activa respecto a los conservados en caja control (Fig. 1). Para el resto de microorganismos estudiados no se encontraron diferencias significativas (datos no mostrados).

Hasta el día 15 de conservación no se observó presencia de podridos. A partir del día 15, sobre todo desde el día 17 hasta el día 22 (fin del estudio de conservación), el número de podridos aumentó considerablemente en los frutos envasados en caja control, siendo significativamente menor el recuento obtenido en caja activa (Fig. 2B).

El parámetro de firmeza nos sirve como indicador del deterioro del producto. En el estudio realizado se observó que los frutos envasados en caja activa presentaron valores de firmeza mayores respecto a los envasados en caja control (Fig. 2A). Y para finalizar, en lo relacionado al análisis sensorial, los tomates conservados en envases activos fueron mejor valorados que los envasados en caja control, en todos los atributos sensoriales estudiados, a lo largo de su vida útil (Fig 2C).

4. CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos, se concluye que los tomates conservados en cajas activas presentan un menor porcentaje de podridos y un menor recuento de microorganismos alterantes del tomate. Además, los tomates de cajas activas obtuvieron una mejor valoración sensorial a lo largo de su vida comercial. Se demuestra que el envasado a granel de tomates frescos en cajas activas de cartón consigue conservar mejor la calidad del tomate y reduce la probabilidad de que presenten podridos a lo largo de su vida comercial. El carácter activo antimicrobiano de este envase no solo consigue retrasar la proliferación de microorganismos sobre la superficie del fruto,

disminuyendo el número de podridos, sino que aumenta también la seguridad alimentaria microbiana de los tomates frescos.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del proyecto financiado por la Consejería de Desarrollo Económico, Turismo y Empleo de la Región de Murcia (convocatoria RIS3-Mur, de agosto de 2016, con expediente de aprobación nº2/16SAE00006) que ha sido realizado por la Universidad Politécnica de Cartagena y la empresa S.A.E. de Cartón Ondulado (Molina de Segura, Murcia) que también ha recibido financiación de este Proyecto. La beca predoctoral de Laura Buendía ha sido también financiada por este Proyecto, donde se encuadra la realización de su tesis doctoral.

6. REFERENCIAS

- [1] Garmin H., Strohm K., Dirksmeyer W. 2014. Tomato – A new crop in agri benchmark Horticulture. Thünen Institute of Farm Economics. San Michele all'Adige.
- [2] Brandwein M., Al-Qntar A., Goldberg H., Mosheyev G., Goffer M., Marin-Iniesta F., López-Gómez A., Steinberg D. 2016. Mitigation of Biofilm Formation on Corrugated Cardboard Fresh Produce Packaging Surfaces Using a Novel Thiazolidinedione Derivative Integrated in Acrylic Emulsion Polymers. *Frontiers in microbiology*, 7.
- [3] Marques H.M.C. 2010. A review on cyclodextrin Encapsulation of essential oils and volátiles. *Flavour and Fragrance Journal*, 25 (5), 313-326.
- [4] Ali A., Noh N.M., Mustafa M.A. 2015. Antimicrobial activity of chitosan enriched with lemongrass oil against anthracnose of bell pepper. *Food packaging and shelf life*, 3, 56-61.

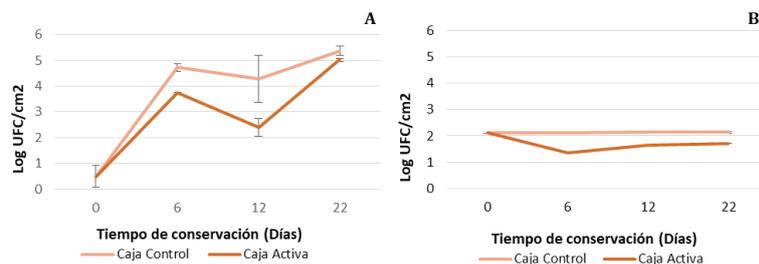


Figura 1. Recuento de la microbiología superficial (Log UFC/cm²) de enterobacterias (A) y mohos (B) en tomate variedad Caniles conservado en refrigeración a 8°C y HR del 85% (hasta el día 6), y a temperatura ambiente (desde el día 7 hasta el 22), en cajas de cartón control sin recubrimiento activo y en cajas de cartón activo.

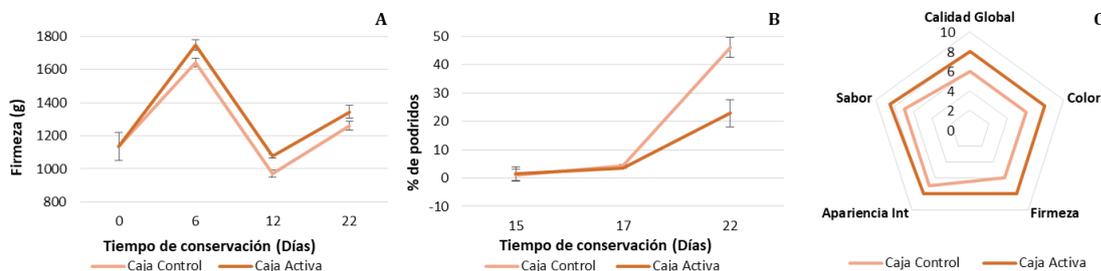


Figura 2. Firmeza (A), porcentaje de frutos podridos (B) y evaluación sensorial (C) en tomate variedad Caniles conservado en refrigeración a 8°C y HR del 85% (hasta el día 6), y a temperatura ambiente (desde el día 7 hasta el 22), en cajas de cartón control sin recubrimiento activo y en cajas de cartón activo.

Influence of antimicrobial ice on the quality of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored at room temperature

Influencia del hielo antimicrobiano en la calidad de lubina fresca (*Dicentrarchus labrax*) conservada a temperatura ambiente

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

Department of Agronomical Engineering, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena. Spain

*laura.navarro@upct.es

Abstract

The demand for fresh seabass (*Dicentrarchus labrax*) has increased over the past decade due to its sensorial and healthy properties. Storage on ice is widely used to preserve fresh fish. However, its shelf-life is relatively short. The aim of this work was to study the influence of use of antimicrobial ice containing essential oils (EOs) encapsulated in β -cyclodextrin (β -CD) on quality of farmed fresh sea bass. Microbiological, physical-chemical and sensorial analyses were carried out to determine the quality changes of sea bass stored at room temperatures (20°C) simulating conditions of show periods in fish market. The use of antimicrobial ice in these conditions improves quality of sea bass.

Keywords: ice; essential oils; quality; shelf life.

Resumen

La demanda de lubina fresca (*Dicentrarchus labrax*) se ha incrementado en la última década debido a su características sensoriales y propiedades saludables. El uso de hielo para la conservación en pescado fresco está muy extendido. A pesar de ello, su vida útil es relativamente corta. El objetivo de este estudio fue evaluar la influencia del uso de hielo antimicrobiano, que contiene aceites esenciales (EOs) encapsulados en β -ciclodextrinas (β -CD), en la evolución de la calidad de lubinas frescas. Se llevaron a cabo análisis microbiológicos, físico-químicos y sensoriales para determinar la evolución de la calidad de las lubinas a lo largo de su conservación en hielo y a temperatura ambiente simulando las condiciones de exposición en la pescadería. El uso de hielo antimicrobiano en estas condiciones de conservación mejora la calidad de las lubinas.

Palabras clave: hielo; aceites esenciales; calidad; vida útil.

1. INTRODUCCIÓN

La lubina (*Dicentrarchus labrax*) es una de las especies más cultivadas en Europa, principalmente en los países mediterráneos, en los cuales se ha visto incrementada su producción acuícola estos últimos años. Los consumidores demandan este producto debido a sus apetecibles y saludables atributos entre los que destacan el suave sabor de su carne blanca y su bajo contenido en grasa [1].

Por otro lado, el pescado fresco es altamente perecedero. De hecho, aunque el almacenamiento en hielo es ampliamente usado para su conservación, la vida útil de la lubina entera almacenada en hielo es relativamente corta [2]. Esta es la razón por la que surgen investigaciones con hielo antimicrobiano. Algunos estudios han utilizado los aceites esenciales (EOs) aplicados directamente en el hielo para preservar mejor el pescado fresco, pero las características sensoriales de estos pescados se ven afectada por el fuerte olor de los aceites esenciales [3]. Las ciclodextrinas son oligosacáridos de monosacáridos de glucosa que permiten la encapsulación de distintas sustancias. Para evitar el fuerte olor de los EOs y aumentar la vida útil de la lubina fresca en el hielo, en este trabajo se utilizó hielo que incluye EOs encapsulados en β -CD. Este hielo antimicrobiano se aplicó directamente sobre las lubinas tal como se hace habitualmente en las pescaderías.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de la conservación de lubinas enteras frescas en hielo normal y hielo con antimicrobianos naturales encapsulados en β -CD, a temperatura ambiente simulando las condiciones de exposición / venta de una pescadería, sobre su calidad y vida útil.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Se tomaron lubinas (*Dicentrarchus labrax*) frescas procedentes de acuicultura (suministradas por la empresa Servicios Atuneros del Mediterráneo, S.L.), con un peso medio de unos 500 g cada una que fueron capturadas y sacrificadas el 10/12/2018. Las lubinas se trasladaron a la UPCT en cajas de poliestireno con hielo normal. A continuación, se introdujeron en cajas de poliestireno con hielo picado normal (Control) y en cajas de poliestireno con hielo picado que incluía una combinación de EOs encapsulados en β -CD. Los EOs con efecto antimicrobianos utilizados fueron carvacrol, bergamota y pomelo (CBP) en una proporción (3:1:1) encapsulados en β -CD con 10% de humedad (Kleptose, Roquette). Estos EOs se disolvieron en el agua de fabricación de hielo en una proporción de 100 mg/kg de hielo. Las cajas de poliestireno se exponían a una temperatura ambiente de 19-20°C en la Planta Piloto de la ETSIA-UPCT durante un tiempo de 8 horas y posteriormente se almacenaban en su mismo envase con tapa en cámara frigorífica a $\pm 2^\circ\text{C}$, en la planta piloto de la ETSIA-UPCT. Este ciclo de exposición a temperatura ambiente y de conservación en cámara se repitió durante 4 días. Las cajas de poliestireno contenían 12 lubinas por caja, y cada día se cogían 3 lubinas para el muestreo diario. Las lubinas se analizaron los días 0, 1, 2 y 3 para determinar la evolución de su calidad. Se simuló el procedimiento habitual de conservación/exposición que se realiza en una pescadería, donde normalmente el pescado se tiene un máximo de 4 días.

2.2 Determinación microbiológica

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

2.3 Parámetros fisicoquímicos

La capacidad de retención de agua (CRA) se determinó expresando el porcentaje de agua que queda retenida en el músculo de pescado. Para la determinación de N-TMA (Nitrógeno de Trimetilamina), se utilizó el método propuesto por Dyer [4], midiendo la absorbancia de la muestra a 410 nm mediante espectrofotómetro Zuzi 4110RS, y se calculó el nitrógeno trimetilamina (N-TMA) en 100 g de pescado con referencia a una curva patrón. Para el pH, se

tomaron 5 g de dorada, que se mezclaron con 10 mL de agua destilada y se sometieron a agitación. Después, se procedió a la medición del pH con un pH-metro Basic 20 (Crison). Además, se realizó un registro de las temperaturas del pescado y del aire que lo rodeaba durante todo el periodo de conservación a temperatura ambiente.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis microbiológico

Los resultados microbiológicos se muestran en la Fig. 1. Observamos que los valores iniciales en todas las lubinas recién capturadas fueron bajos para todos los microorganismos estudiados, lo que es indicativo de buenas prácticas de captura y manipulación posterior. Observamos un aumento en los recuentos de los microorganismos durante los 4 días de conservación a 19-20°C durante 8 horas al día y su conservación a 2°C en cajas de poliestireno el resto del tiempo. La evolución de las *Enterobacteriaceae* es bastante constante a lo largo del periodo de conservación, con valores inferiores a 2 log UFC/g. En el último día de conservación (día 3) observamos que las lubinas conservadas en hielo antimicrobiano presentan un recuento más bajo en los microorganismos aerobios mesófilos totales (3,5 log UFC/g) si lo comparamos con los recuentos obtenidos para las lubinas conservadas en hielo control (5 log UFC/g). El hielo antimicrobiano redujo medio ciclo logarítmico el crecimiento de los microorganismos psicrófilos en las lubinas conservadas en hielo antimicrobiano.

3.2 Parámetros fisicoquímicos

En la determinación de los parámetros pH, CRA y textura, se observó que los valores se mantuvieron muy constantes durante todo el periodo de almacenamiento independientemente del tratamiento realizado (datos no mostrados). Los valores obtenidos para pH se encontraron en una media de 6,7 durante todo el periodo de conservación. La capacidad de retención de agua se mantuvo en un rango del 70-80%, considerado pescado fresco según Campus [5]. Los valores de dureza, que representan la textura en el músculo de la lubina, son muy similares, aunque existe una leve disminución al final del periodo de conservación sin observarse diferencias significativas entre los dos tipos de hielo. En cambio, en los resultados obtenidos en N-TMA (Fig. 2) se observaron diferencias significativas entre los dos tipos de hielo. Los valores de N-TMA para las lubinas conservadas en hielo normal fueron mayores que para las conservadas en hielo con antimicrobiano, obteniendo valores de 0,8 y 0,4 mg/100 g respectivamente. Esto es indicador de un mayor deterioro en las lubinas control, aunque ambos tratamientos mantienen el pescado fresco (según la FAO, 1986) por mantenerse en valores inferiores a 1 mg/100 g. A nivel sensorial, se observó una mejor conservación de las lubinas almacenadas con hielo antimicrobiano. Las lubinas conservadas en hielo control presentaban un menor brillo en la piel, mayor opacidad de la córnea y ligero olor a pescado deteriorado.

4. CONCLUSIONES

La lubina fresca conservada en hielo antimicrobiano mostró recuentos microbiológicos más bajos que las lubinas conservadas en hielo control debido a las propiedades antimicrobianas de los EOs tanto en microorganismos mesófilos totales como en psicrófilos. En cuanto a los parámetros de calidad, la lubina fresca conservada en hielo antimicrobiano muestra valores inferiores para el N-TMA, indicando mayor frescura que el pescado conservado en hielo normal. Las β -CD son reconocidas como sustancias GRAS para su uso en la industria alimentaria [6], por lo tanto, el hielo antimicrobiano que incluye EOs encapsulados en β -CD se demuestra como una alternativa viable y eficaz para mejorar la calidad del pescado fresco.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del proyecto ICE2LAST (Innovative technology based on the integration of natural substances in ice to improve welfare and extend shelf-life of farmed fish) realizado con en colaboración con la empresa CubiPlaya S.L. y Pescados de Acuicultura de Murcia S.L. (San Pedro del Pinatar, Murcia).

6. REFERENCIAS

[1] APROMAR 2018. Informe La Acuicultura en España.

[2] Taliadourou, D., Papadopoulou, V., Domvridou, E., Savvaidis, N., Kontominas, MG. 2003. Microbiological, chemical and sensory changes of whole and filleted Mediterranean aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *J Sci Food Agric.* 83:1373–1379.

[3] Bensid, A., Ucar, Y., Bendeddouche, B., & Özogul, F. 2014. Effect of the icing with thyme, oregano and clove extracts on quality parameters of gutted and beheaded anchovy (*Engraulis encrasicolus*) during chilled storage. *Food Chem*, 145: 681-686.

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

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

[6] Ayala-Zavala, J.F., Soto-Valdez, H., González-León, A., Álvarez-Parrilla, E., Martín-Belloso, O., González-Aguilar, G.A. 2008. Microencapsulation of cinnamon leaf (*Cinnamomum zeylanicum*) and garlic (*Allium sativum*) oils in β -cyclodextrin. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 60, 3-4: 359-368.

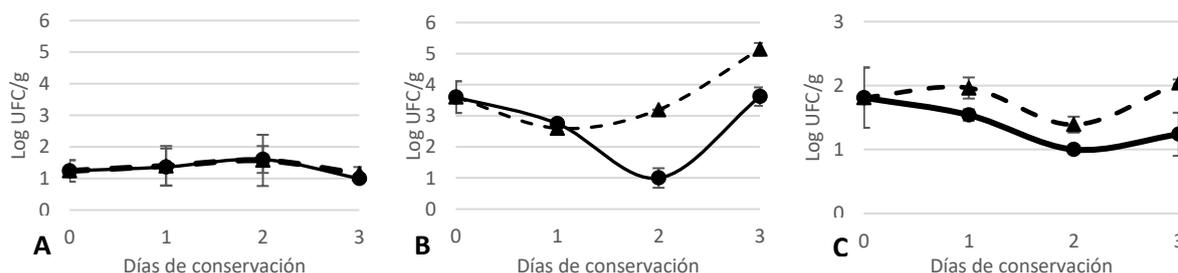


Figura 1. Recuentos (Log UFC/g) de *Enterobacteriaceae* (A), AMT (B) y Psicrófilos (C) en lubina fresca entera conservada en hielo control (línea discontinua) y en hielo antimicrobiano con EOs (línea continua), en condiciones de pescadería. Las barras verticales representan la desviación estándar (SD).

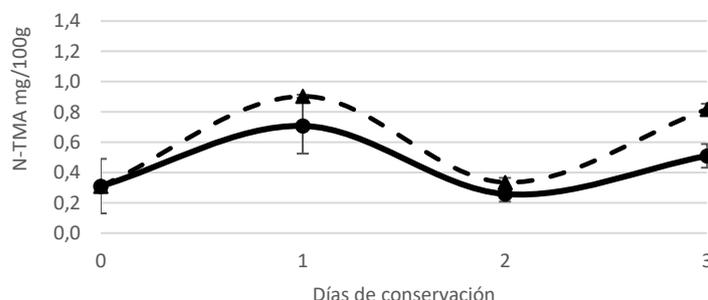


Figura 2. Evolución del N-TMA (mg/100g) en lubina fresca entera conservada en hielo control (línea discontinua) y en hielo con antimicrobiano (línea continua), en condiciones de pescadería. Las barras verticales representan la desviación estándar (SD).

Food labeling as a tool of the circular economy

El etiquetado de alimentos como herramienta de la Economía Circular

J.M. Donate-Hernandez*, M.D. de-Miguel

Departamento de la Economía de la Empresa. Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica. Paseo Alfonso XIII, Nº 48. 30201. Cartagena. Spain

*chemadonate@gmail.com

Abstract

The increase in world population and the current system of consumption requires a new system of understanding of the economy, which consists of redesigning, producing, consuming, reusing and recycling. Food labelling comes into play within the circular economy system, which provides the consumer with information not only at the time of purchase, but also in future decisions. The current information on food is regulated in Europe by Regulation 1169/2011 of the European Parliament, but this information is not enough to know aspects such as health, environment respect, the quality of the product, the process, the use, the reuse and the journey of the food container and others. Information required for the process of changing the circular economy. In this aspect, the innovation of this information can come into play. To ensure that the consumer accesses this information, it is required that this innovation be demanded by the use of new technologies, with the application of new labels.

Keywords: efficient use; CO₂ footprint; sustainability; consumer; re-design.

Resumen

El aumento de la población mundial y el sistema actual de consumo requiere un nuevo sistema de entendimiento de la economía, consistente en rediseñar, producir, consumir, reutilizar y reciclar. Dentro del sistema de economía circular entra en juego el etiquetado de alimentos, que aporta al consumidor una información no solo en el momento de compra sino en futuras decisiones. La actual información presente en los alimentos está regulada en Europa por el Reglamento 1169/2011 del Parlamento Europeo, pero esta información no es suficiente para conocer aspectos de la salud, el respeto por el medio ambiente, la calidad del producto, proceso, uso, re-uso y/ destino del envase y otros, información requerida para el proceso de cambio de la economía circular. En este aspecto puede entrar en juego la innovación de esta información. Para garantizar que el consumidor acceda a esta información se requiere que esta innovación esté soportada por el uso de las nuevas tecnologías, con la aplicación de nuevas etiquetas.

Palabras clave: uso eficiente; huella de CO₂; sostenibilidad; consumidor; re-diseño.

1. INTRODUCCIÓN

Ante el sistema económico actual de comprar, usar y tirar, surge la economía circular con el propósito de transformar dicho sistema económico. La economía circular tiene como eslabón principal dar valor al producto, en primer lugar, con una producción sostenible, en segundo lugar,

consiguiendo que este esté dentro del sistema económico el mayor tiempo posible, en tercer lugar, reduciendo al mínimo los residuos y dándole al producto una nueva función para alargar su vida dentro del sistema. La economía circular presenta un gran beneficio para la sociedad de consumo, apostando por un menor consumo de energía y la producción con menores emisiones de gases de efecto invernadero, en concreto el dióxido de Carbono (CO₂), por lo que tiene gran impacto en los objetivos de la Unión Europea. [1].

La economía circular está basada en varios aspectos: 1. *Diseño del Producto*: una renovación del diseño de los productos actuales, pueden asegurar productos más resistentes y duraderos, con facilidad para reparar, mejorar o reconstruir y puede permitir recuperar materiales a la hora del reciclado; 2. *Producción*: Las materias primas utilizadas cumplen una función muy importante, teniendo en cuenta las consecuencias medioambientales, como también la acción de proactividad entre empresas de tal manera que los subproductos de una empresa son utilizados para materias primas de otra; 3. *Consumo*: aquí entra en juego la importancia del etiquetado, ya que con la información recibida el consumidor puede hacer una mejor elección de los productos, en función de precio y calidad con la opción de adquirir productos que sean más responsables con el medio ambiente; 4. *Gestión de residuos*: juega un papel muy importante en la economía circular, se trata de gestionar minimizando el residuo y siendo lo más respetuoso con el medio ambiente, minimizando la energía, aprovechando la ya consumida y recuperando los materiales con gran valor para que vuelvan al sistema productivo, estando en contraposición con el sistema actual en que la mayoría de los materiales terminan su vida útil en vertederos, sin poder ser recuperados. Es fundamental para mejorar las tasas de reciclado actuales realizar una selecta discriminación de los residuos; 5. *Uso de residuos como materias primas*: unos de los mayores temores que nos encontramos es la garantía de calidad de estos residuos, muy diferente son los desechos orgánicos, que necesitan tener unas normas de calidad. [1].

Cuando se persigue una interacción entre sectores industriales, para obtener una continuidad y cerrar la cadena, surgen otros elementos que se han de considerar; en primer lugar, los plásticos, aumentando su reciclaje, pero apostando por mejorar los sistemas de recogida y discriminación, se evita que lleguen a vertederos e incineradoras, aunque con la aparición de nuevos plásticos se está cuestionando su biodegradabilidad, también se ha de tener en cuenta la necesidad de no generar residuos alimentarios, reducir el desperdicio de alimentos comestibles que terminan en la basura, afectando a toda la cadena alimentaria, desde la producción hasta el consumidor final. [1].

El etiquetado de alimentos tiene mucho que contribuir en la economía circular, el etiquetado de alimentos es la principal vía de comunicación entre el productor y el consumidor final [1]. Los consumidores deben estar debidamente informados de forma que se garantice su derecho a la información, deben conocer que alimentos están consumiendo y que no induzca a engaño [2]. La información de las etiquetas de alimentos puede tener una influencia positiva en la dieta de los consumidores, ya que esta información está relacionada con la composición de los alimentos [3]. Los consumidores valoraban características de los alimentos como, sabor, apariencia y el aroma, pero en los últimos años se valoran aspectos relacionados con la salud, comodidad y la forma que ha sido procesado [4]. Igualmente, la etiqueta puede proporcionar al consumidor mucha más información del alimento que va a ser adquirido en el proceso de compra, estudios empíricos han demostrado que la información adicional es percibida como un valor añadido y este es pagado por el consumidor como un alimento de mayor calidad, como método de producción, origen y beneficio para la salud, etc. [5]. Por ello, los consumidores buscan en las etiquetas si la producción de un alimento ha sido sostenible, de ahí una de sus utilidades. [6].

Se conoce la relación que existe entre el sobrepeso; la obesidad, y la mala alimentación, lo que en el futuro se espera un aumento de enfermedades crónicas, a largo plazo hará disminuir la esperanza de vida dentro de los ciudadanos de la Unión Europea, por esta razón en los últimos diez años ha aumentado la concienciación del consumidor por la salud y por el medio ambiente.

La elección del consumidor de hábitos saludables, relacionados con un estilo de vida y una buena alimentación, se corresponden al obtener una información en el etiquetado fácil de entender, lógica y verificable en el proceso de compra de los alimentos, pero en contraposición el consumidor recibe también información de elementos culturales, medios de comunicación y marketing, orientados más a la comercialización del producto que a la salud del consumidor [7].

La degradación del medio ambiente y los medios para combatirlo ha contribuido a sensibilizar al consumidor en la elección de los alimentos [8] por eso el consumidor es cada vez más consciente de la importancia de una buena alimentación, y por ello la tendencia hacia el conocimiento en materia de alimentos es mayor [9]. Siendo el etiquetado el elemento que ayuda al consumidor a estar informado sobre la calidad del producto y de su producción, lo que influye en futuras decisiones de compra y para que esto ocurra la información debe ser entendida cómo una mejora de la capacidad y gestión económica [10]. Toda la información reflejada en la etiqueta del alimento permite la diferenciación de productos e informar de la calidad que presenta, pero todo esto no tiene espacio en la etiqueta de un alimento para ser transcrita [11]. Para llevar a cabo la caracterización del producto es necesario aportar mucha información, que difícilmente puede reflejarse en una etiqueta, siendo factible el diseño de una etiqueta con un código para acceder a esa información mediante el uso de dispositivos electrónicos [9].

Los objetivos que se persiguen con esta investigación son:

1. Comprobar que la información recibida por el consumidor no es suficiente en materia de salud, concienciación con el medio ambiente, residuos y reciclaje.
2. Reflejar la importancia del etiquetado en la economía circular, y su contribución positiva al favorecimiento tanto de la salud de los consumidores como en la información recibida en materia de gestión de residuos.
3. Inducir a un nuevo etiquetado más acorde con la sociedad actual y reflejar los beneficios de un etiquetado responsable dentro de la economía circular.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología del estudio consiste en la revisión de los productos producidos por las empresas agroalimentarias españolas y europeas, para afrontar la obtención de datos se utilizará una encuesta online dirigido a gerentes de empresas agroalimentarias. Se analizará el grado de cumplimiento de la Normativa que regula el etiquetado, a través de una muestra representativa elegida al azar de los principales productos alimentarios que configuran la cesta de la compra de un ciudadano europeo de clase social media. Determinar el grado de sostenibilidad del envasado de los productos agroalimentario a través de un muestreo prospectivo de los diferentes tipos de envasado, y ver su capacidad de reutilización para incorporarlo al concepto de economía circular. La información del consumidor se obtendrá a través de una encuesta en la que se recogerá su aptitud hacia determinados productos, preferencias y opiniones sobre envasado, etiquetado, reciclaje y Economía Circular.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 22.977 empresas del sector de alimentación que están censadas en la base de datos SABI, solo 2.775 son empresas con proyección internacional. En este tipo de empresas exportadoras/ importadoras, es el que se va a centrar el estudio. Se está diseñando una encuesta que se lanzará por correo electrónico a todas las empresas antes mencionadas y se tratará de detectar el grado de cumplimiento de las normativas y el estado de la innovación en sus etiquetas y envasado. Para que la información recoja la opinión de todas las partes interesadas, es decir de los stakeholders, se recabará, también, la opinión de los consumidores mayores de 18 años, en

una muestra de unos 100 individuos, completando la toma de información con la entrevista a unos/as 30 Directivos/as de empresas, relacionándolos con los productos que constituyen la cesta de la compra. Los instrumentos metodológicos estarán basados en un cuestionario socio-demográfico. El tratamiento y análisis estadístico constará de un estudio piloto del que previamente se realizará un análisis descriptivo y factorial exploratorio. Al no haber procedido a realizar toma de datos vía encuesta, no procede analizar los resultados e incluirlos en este apartado.

4. CONCLUSIONES

Se pretende conseguir que el etiquetado sea un elemento más dinámico, más informativo y más completo para el consumidor final y por otro lado que el envasado de los productos agroalimentarios puedan ser reutilizados en un sistema productivo y más eficiente y respetuoso con el medio ambiente.

5. AGRADECIMIENTOS

El doctorando desea manifestar un más sincero agradecimiento a todas aquellas empresas que han ayuda en esta investigación.

6. REFERENCIAS

- [1] European Commission. 2015. Cerrar el Círculo: un plan de acciones de la UE para la economía circular. Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo, al Consejo, al Comité Económico y Social Europeo y al Comité de las Regiones.
- [2] Reglamento (UE) No 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor. DOUE de 22 de noviembre de 2011; L 304: 18-63.
- [3] Temple, N. J., & Fraser, J. 2014. Food labels: a critical assessment. *Nutrition*, 30(3), 257-260.
- [4] Barreiro-Hurlé, J., Gracia, A., & De-Magistris, T. 2009. Market implications of new regulations: impact of health and nutrition information on consumer choice. *SJAR*, 7(2), 257-268.
- [5] Gracia, A., & de-Magistris, T. 2016. Consumer preferences for food labeling: what ranks first? *Food Control*, 61, 39-46.
- [6] Weinrich, R., & Spiller, A. 2016. Developing food labelling strategies: Multi-level labelling. *J clean prod*, 137, 1138-1148.
- [7] European Commission. 2007. A European strategy on health issues connected to nutrition, overweight and obesity. White paper COM (2007), 279.
- [8] McEachern, M. G., & Schroeder, M. J. 2004. Integrating the voice of the consumer within the value chain: a focus on value-based labelling communications in the fresh-meat sector. *J consum mark*, 21(7), 497-509.
- [9] Banterle, A., Cavaliere, A., & Ricci, E. C. 2012. Food labelled information: an empirical analysis of consumer preferences. *Int. J. Food Syst. Dyn*, 3(2), 156-170.
- [10] Verbeke, W., & Ward, R. W. 2006. Consumer interest in information cues denoting quality, traceability and origin: An application of ordered probit models to beef labels. *Food qual prefer*. 17(6), 453-467.
- [11] Tonsor, G. T. 2011. Consumer inferences of food safety and quality. *Eur. Rev. Agric. Econ*. 38(2), 213-235.

Comparison of the FTase activity of extra and intracellular enzymes of fungal origin for the production of scFOS

Comparación de la actividad FTasa de enzimas extra e intracelulares de origen fúngico para la producción de scFOS

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

Department of Agronomical Engineering, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, 30203 Cartagena. Spain

*mjose.sanchez@upct.es

Abstract

The short-chain fructooligosaccharides (scFOS) are oligosaccharides that have a great interest as prebiotics. Fructosyltransferase enzymes (FTases) carry out the production of scFOS by enzymatic hydrolysis of sucrose. Different microorganisms, including fungi and bacteria, are able to produce these enzymes, however, FTases of fungal origin are most commonly used in the industrial production of scFOS. Due to the high cost of these enzymes, it is interesting to minimize the needed amount of these catalysts by optimizing its specific activity. The present work focuses on the comparison of the fructosyltransferase activity of intracellular and extracellular enzymes of fungal origin. Results showed that intracellular FTase produced by the fungal strain AAC2014 displayed greater specific enzymatic activity than extracellular ones.

Keywords: fructooligosaccharides; fungal fructosyltransferase; intracellular; extracellular.

Resumen

Los fructooligosacáridos de cadena corta (scFOS) son oligosacáridos que tienen gran interés como prebióticos. La producción de scFOS mediante hidrólisis enzimática de la sacarosa es catalizada, entre otras, por la enzima fructosiltransferasa (FTasas). Distintos microorganismos son capaces de producir esta enzima, sin embargo, son las FTasas de origen fúngico las más comúnmente utilizadas para la producción industrial de scFOS. Debido al alto precio de estos catalizadores, es de gran interés optimizar su actividad específica con el fin de disminuir al mínimo la cantidad utilizada de enzima. Por lo anterior, este trabajo se centra en la comparación de la actividad fructosiltransferasa de enzimas intracelulares y extracelulares de origen fúngico. Los resultados mostraron que las FTasas intracelulares producidas por la cepa fúngica AAC2014 presentaban mayor actividad enzimática específica que las extracelulares.

Palabras clave: fructooligosacáridos; fructosiltransferasa fúngica; intracelular, extracelular.

1. INTRODUCCIÓN

Los FOS son carbohidratos prebióticos con efectos positivos en la obesidad y diabetes [1]. Estos oligosacáridos presentan una estructura química compuesta de cadenas lineales de D-

fructosa unidas por enlaces β (2→1), con una molécula de D-glucosa terminal unida por un enlace α (2→1) [6]. Los FOS pueden ser producidos por transfructosilación de sacarosa mediante las enzimas β -D-fructofuranosidasas (FFasas, EC 3.2.1.26) o transfructosilasas (FTasas, EC 2.4.1.9) [4], dando lugar a FOS de cadena corta (scFOS): 1-kestosa (GF₂), 1-nistosa (GF₃) y 1-fructofuranosil-nistosa (GF₄) [7,8,10]. Existen numerosos estudios sobre una gran cantidad de hongos con capacidad para la producción de enzimas FTasa las cuales pueden ser extracelulares, cuando se excretan fuera de la célula, o intracelulares cuando permanecen en su interior [2]. *Aureobasidium pullulans* [11] y *Aspergillus niger* [3] son los microorganismos a partir de los que se obtiene las FTasas fúngicas más utilizadas a nivel industrial. Sin embargo, estas enzimas tienen un alto precio lo que conlleva un proceso de producción de scFOS caro. Con el fin de optimizar dicho proceso productivo, así como su posterior aplicación a nivel industrial, el objetivo del presente trabajo ha sido comparar la actividad fructosiltransferasa de enzimas intracelulares y extracelulares sintetizadas por el hongo AAC2014 durante su metabolismo fermentativo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Producción de las enzimas FTasas a partir del hongo AAC2014

Para el crecimiento del hongo AAC2014 se emplea el siguiente medio de cultivo: 20% sacarosa, 2% extracto de levadura, 0,84% K₂HPO₄, 0,102% MgSO₄ x 7H₂O, 0,088% KCl, 0,007% FeSO₄ x 7H₂O, 0,085 % NaNO₃ x 4H₂O y 0,136 % CaCO₃ en pH 5,5. Se toman 100 mL de medio y se inocula al 1,0% con 1*10⁷ esporas/mL, y se incuba a 28°C y 180 rpm durante 96 horas. Para la separación de las enzimas intracelulares y extracelulares, se filtra el medio de cultivo en filtro Wathman nº 1. La fase líquida, fuente de enzimas extracelulares, se concentra a vacío hasta 5 veces en volumen. Y la biomasa separada, fuente de enzimas intracelulares (0,7 g), se lava con tampón acetato de sodio 50 mM, pH 5,0 y se congela con 3 mL de este tampón a -18°C.

2.2 Producción de scFOS a partir de enzimas extracelulares

Para la producción de scFOS a partir de enzimas extracelulares se mezclan las enzimas concentradas (20 mL) con una solución de sacarosa de 60ºBrix, en tampón fosfato 50 mM pH 5,5 y se incuba a 50°C y 50 rpm durante 48 horas, realizando muestreos a lo largo de este tiempo. La inactivación enzimática de cada muestra se realiza mediante baño a 100°C durante 10 minutos.

2.3 Producción de scFOS a partir de enzimas intracelulares

Para la producción de scFOS a partir de enzimas intracelulares se mezclan las enzimas (3 mL+0,7 g) con una solución de sacarosa a 60ºBrix en tampón fosfato 50 mM pH 5,5 y se incuba a 50°C y 50 rpm durante 48 horas, realizando muestreos a lo largo de este tiempo. En cada muestra se realiza una inactivación enzimática en baño a 100°C durante 10 minutos.

2.4 Determinación de azúcares simples y scFOS mediante cromatografía líquida

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

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Producción de scFOS a partir de la enzima FTasa extracelular obtenida del hongo AAC2014

El rendimiento en la producción de scFOS a partir de las enzimas extracelulares concentradas se determinó como la cantidad de scFOS producido con respecto a la concentración de sacarosa inicial. Podemos observar en la Figura 1A que el rendimiento de transformación ha sido de un 45% y se mantuvo casi estable desde las 30 horas de fermentación enzimática. Por otro lado, el perfil de scFOS obtenido tras 48 horas de fermentación estaba compuesto por 81,16% de GF₂ y 18,8% de GF₃ y ausencia de producción de GF₄ (Figura 1B).

3.2. Producción de scFOS a partir de la enzima FTasa intracelular obtenida del hongo AAC2014

En el caso de la producción de scFOS a partir de las enzimas intracelulares se obtuvo una transformación del 53% de la sacarosa en scFOS. Según vemos en la Figura 2A, la concentración de scFOS se mantuvo casi constante a partir de las 44 horas de fermentación enzimática con 325 g scFOS /L. Sin embargo, el perfil de scFOS (Figura 2B) sigue cambiando tras 44 horas, porque la función hidrolítica ha cesado, pero continúa la función FTasa, dando lugar a la formación de scFOS de estructura más compleja, disminuyendo la cantidad de GF₂ y aumentando la de GF₃ y GF₄. Esta producción de scFOS alcanza un nivel similar a la obtenida por Sánchez et al. (2010) a partir de la biomasa de un cultivo de 48 horas de *Aspergillus* sp. N74 en el que se observó una producción de scFOS de aproximadamente 50% (p/p) (basada en la concentración inicial de sacarosa).

4. CONCLUSIONES

Se obtiene una mayor producción de scFOS a partir de las enzimas intracelulares del cultivo de 96 horas del hongo AAC2014 en comparación con la producción de scFOS obtenida a partir de las enzimas extracelulares concentradas. Por tanto, la actividad FTasa de los enzimas intracelulares es mayor que en los enzimas extracelulares de este hongo, lo que significa que se tendría que utilizar una menor cantidad de estos enzimas para obtener scFOS.

5. AGRADECIMIENTOS

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

6. REFERENCIAS

- [1] Kumar C.G., Sripada S., Poornachandra Y. 2018. Status and Future Prospects of Fructooligosaccharides as Nutraceuticals. In Role of Materials Science in Food Bioengineering. Pp.451-503.
- [2] Ganaie M.A., Gupta U.S. 2014a. Recycling of cell culture and efficient release of intracellular fructosyltransferase by ultrasonication for the production of fructooligosaccharides. Carbohydr. Polym. 110: 253-258.
- [3] Hidaka H., Hirayama M., Sumi S.A. 1988. Fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. Agric. Biol. Chem. 52: 1187-1988.
- [4] Maiorano A.E., Piccoli R.M., Da Silva E.S., de Andrade Rodrigues M.F. 2008. Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics. Biotechnol. Lett. 30: 1867-1877.
- [5] Mishra S., Mishra H.N. 2013. Effect of synbiotic interaction of fructooligosaccharide and probiotics on the acidification profile, textural and rheological characteristics of fermented soy milk. Food Bioprocess. Technol. 6:3166-3176.
- [6] Niness K. 1999. Breakfast foods and the health benefits of inulin and oligofructose. Cereal Foods World 44: 79-81.
- [7] Roberfroid M.B., Delzenne N.M. 1998. Dietary fructans. Annu. Rev. Nutr. 18: 117-143.

[8] Sánchez O., Guio F., García D., Silva E., Caicedo L. 2008. Fructooligosaccharides production by *Aspergillus* sp. N74 in a mechanically agitated airlift reactor. Food Bioprod. Process. 86: 109-115.

[9] Sánchez O F, Rodriguez A M, Silva E, Caicedo L A. 2010. Sucrose biotransformation to fructooligosaccharides by *Aspergillus* sp. N74 free cells. Food bioprocess. Tech. 3: 662-673.

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

[11] Yun J.W., Song S.K. 1996. Continuous production of fructooligosaccharides using fructosyltransferase immobilized on ion exchange resin. Biotechnol. Bioprocess. Eng. 1: 18-21.

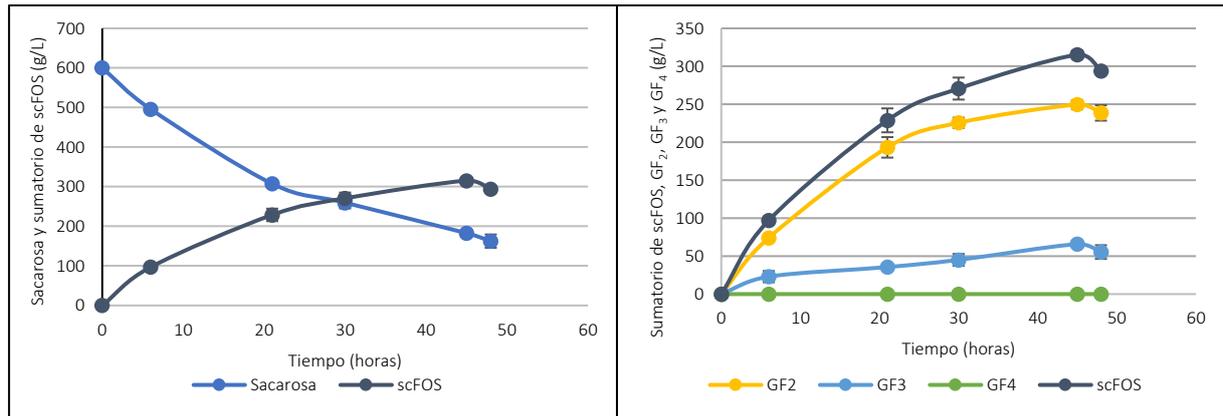


Figura 1A (izquierda). Evolución de la concentración de sacarosa y del sumatorio de scFOS (GF₂+GF₃+GF₄) durante la fermentación enzimática con enzimas extracelulares en solución de 60ºBrix a 50ºC. **Figura 1B (derecha)** Perfil de scFOS según la concentración de GF₂, GF₃, GF₄ y el sumatorio de los mismos (denominado como scFOS) durante la fermentación enzimática con enzimas extracelulares en una solución de 60ºBrix y a 50ºC.

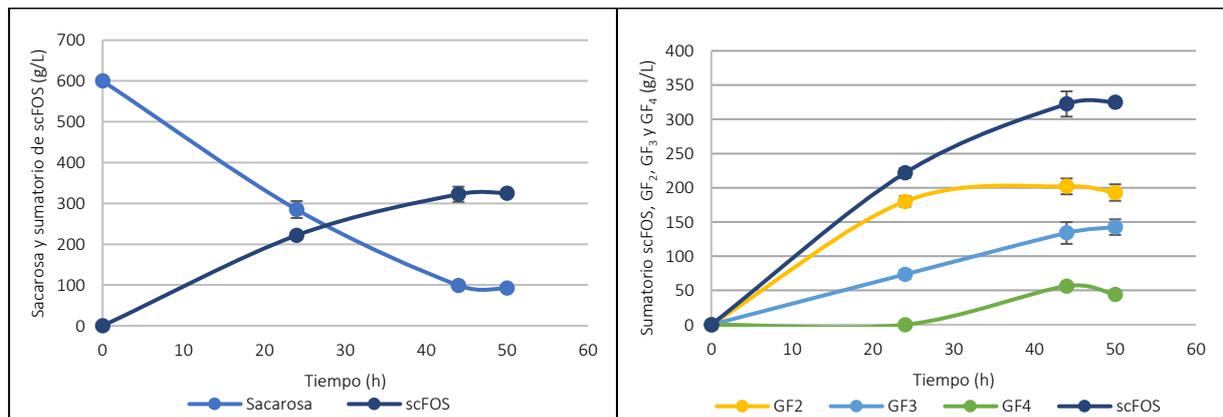


Figura 2 A (izquierda). Evolución de la concentración de sacarosa y del sumatorio de scFOS (GF₂+GF₃+GF₄) durante la fermentación enzimática de las enzimas intracelulares en solución de 60ºBrix a 50ºC. **Figura 2 B (derecha)** Perfil de scFOS según la concentración de GF₂, GF₃, GF₄ y el sumatorio de los mismos (denominado como scFOS) durante la fermentación enzimática con las enzimas intracelulares en una solución de 60ºBrix y a 50ºC.

Effect of the synergy of electric pulses and oregano essential oil in the inactivation of *L. monocytogenes*

Efecto de la sinergia de pulsos eléctricos y aceite esencial de orégano en la inactivación de *L. monocytogenes*

M. Clemente-Carazo^{1*}, A. Garre¹, V. Sánchez², I. Clemente³, S. Condón-Abanto⁴, P.S. Fernández¹, P.M. Periago¹, J.G. Lyng³

¹Departamento de Ingeniería Agronómica, Instituto de Biotecnología Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena (ETSIA), Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena, España. Spain

²Departamento de Tecnología de los Alimentos, Grupo de Análisis y Simulación de Procesos Alimentarios (ASPA), Universitat Politècnica de València, 46022, Valencia. Spain

³School of Agriculture and Food Science, University College Dublin, Belfield, Dublin 4. Ireland

⁴Grupo Nuevas Tecnologías de Conservación de Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Calle Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza. Spain

*marta.clemente@edu.upct.es

Abstract

Nowadays *Listeria monocytogenes* is one of the main concerns of the food industry. The number of cases reported in the European Union is relatively low it is very serious, with rates of hospitalization and mortality of 97% and 16.7%, respectively. Due to the ubiquity of this organism and its capacity to grow in many food matrices, agri-food companies must apply treatments that inactivate the cells of *L. monocytogenes*.

In this work, it was studied the kinetics of inactivation of *L. monocytogenes* isolated from marine products subjected to a combined treatment of PEF with an essential oil of oregano. The results show this synergy, since it got a greater inactivation microbial with a field of 20 KV/cm, 1 Hz frequency, 150 pulses and an oregano concentration of 1/2 MIC, higher than that obtained in control samples. Concluding that the PEF promote the effect of oregano on the bacterial cell membrane.

Keywords: field; frequency; PEF.

Resumen

Listeria monocytogenes es actualmente una de las principales preocupaciones de la industria alimentaria. Aunque el número de casos reportados en la Unión Europea es relativamente, tiene una gran gravedad, con unas tasas de hospitalización y mortandad del 97% y del 16,7%, respectivamente. Debido a la ubicuidad de este microorganismo y su capacidad de crecer en numerosas matrices alimentarias, las empresas agroalimentarias deben aplicar tratamientos que inactiven las células de *L. monocytogenes*.

En este trabajo, se estudió la cinética de inactivación de *L. monocytogenes* aislada de productos marinos sometida a un tratamiento combinado de PEAV con un aceite esencial de orégano. Los resultados demuestran esta sinergia, ya que se consiguió una mayor inactivación microbiana con un campo de 20 kV/cm, 1 Hz de frecuencia, 150 pulsos y una concentración de orégano de 1/2 MIC, superior a la obtenida en las muestras control.

Llegando a la conclusión de que los PEAV impulsan el efecto del orégano sobre la membrana de la bacteria.

Palabras clave: campo; frecuencia; PEAV.

1. INTRODUCCIÓN

El 99% de los casos de listeriosis se asocian al consumo de alimentos listos para su consumo (RTE, del inglés ready to eat). La prevalencia de *Listeria monocytogenes* en el ambiente de la industria alimentaria hace muy difícil, si no imposible, su erradicación [1].

En el último siglo han emergido una gran cantidad de nuevas tecnologías basadas en la no utilización de calor, como alternativa a los tratamientos convencionales. La tecnología de pulsos eléctricos de alto voltaje es un tratamiento no térmico de descontaminación que da lugar a la inactivación y deterioro de algunas bacterias patógenas [2, 3, 4, 5, 6]. Consiste en aplicar pulsos de alto voltaje (kV) y de una corta duración (μ s) a una matriz colocada entre dos electrodos. Esto da lugar a una reorganización de las cargas de la membrana incrementando la permeabilidad de esta al paso de los iones y moléculas, lo que provocará poros en la membrana, a este fenómeno se le denomina electroporación.

Los aceites esenciales son considerados como metabolitos secundarios y poseen propiedades antimicrobianas [7]. En este estudio se evaluó el efecto del antimicrobiano ante una cepa salvaje de *Listeria monocytogenes* previamente sometida a pulsos eléctricos de alto voltaje.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Medios y reactivos

Se utilizaron agar tripticasa-soja (TSA) y caldo tripticasa-soja (TSB). Estos medios fueron enriquecidos con un 0,6% de extracto de levadura (TSA+YE y TSB+YE, respectivamente). Para hacer diluciones se utilizó maximum recovery diluent (MRD).

Se preparó tampón McIlvaine citrato-fosfato ajustando el pH a 7,0 y una conductividad de 6 mS/cm para simular la de una matriz de pescado.

2.2 Microorganismos

La cepa de *Listeria monocytogenes* que se utilizó para el estudio, es una cepa aislada de un producto marino por el departamento: The Food and Health Section in the School of Agriculture and Food Science at UCD.

2.3 Preparación de las suspensiones

Desde el cultivo fresco, compuesto por TSA+YE, se pasó una colonia a un tubo de ensayo con 5 mL de TSB+YE estéril y se incubó durante 18 horas en una estufa a 37°C. A continuación, se inocularon 0,1 mL de los tubos de ensayo en 50 mL TSB+YE estéril para alcanzar una concentración microbiana de 10⁶ UFC/mL y se volvieron a incubar durante 24 horas en una estufa a 37°C.

2.4 Tratamiento PEAV

2.4.1 Equipo de PEAV y preparación de la muestra

Se preparó un tubo eppendorf con 1000 μ l de los cuales: 900 μ l de tampón McIlvaine y 100 μ l del microorganismo, se introdujeron en una cubeta y posteriormente fue llevado al equipo de PEAV. El equipo usado en este estudio fue un ELCRACK HVP5 (German Institute for Food Technologies (DIL), Quakenbrück, Germany). Se estudió la cinética de inactivación con las

siguientes condiciones del equipo: 1 Hz, 0,2 cm anchura de los electrodos y un tiempo entre pulsos de 2 μ s. Se llevaron a cabo muestras control sin tratamiento por PEAV.

2.4.2 Preparación del antimicrobiano

Fueron preparadas diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano, en ellas se resuspendieron 100 μ l del tratamiento PEAV. Y se dejó actuar el orégano durante 20 minutos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar, se determinó el efecto de la intensidad de campo eléctrico en la inactivación microbiana en ausencia de antimicrobiano. La Fig. 1 muestra las curvas de supervivientes obtenidas para diferentes configuraciones del tratamiento. Con 10 pulsos en un campo de 20 kV/cm, el tratamiento ya es capaz de reducir 0,5 ciclos logarítmicos. Con una frecuencia de 300 pulsos en este mismo campo eléctrico se alcanzó una inactivación de aproximadamente 6 ciclos logarítmicos, alcanzando el límite de detección. La formación de poros en la membrana citoplasmática microbiana requiere campos eléctricos superiores a 15 kV/cm [8].

En la Fig. 2 se ilustran las curvas de inactivación obtenidas cuando se añade un aceite esencial de orégano al medio de recuperación tras el tratamiento. Se observa una mayor inactivación con respecto al tratamiento de PEAV (Fig. 1). Esto es debido a que después del tratamiento con PEAV se han dañado un porcentaje de células y la interacción del orégano en estas da lugar a dañar las demás células a lo largo del tratamiento. Se comprobó que cuando se aplicaba el orégano durante 20 minutos con la muestra resuspendida tras el tratamiento con PEAV, hay una gran reducción de hasta aproximadamente 6 ciclos logarítmicos según la concentración de orégano, esto puede ser debido a que el orégano necesita un tiempo de actuación para poder interceder en la célula microbiana (Fig. 2).

Finalmente, en la Fig. 3, se muestra que el efecto de los tratamientos combinados de PEAV a 20 kV/cm resuspendido en 1/2MIC de aceite esencial de orégano, puede llegar a inactivar más del doble de UFC/mL que si se llevan a cabo los tratamientos por separado.

4. CONCLUSIONES

Un campo eléctrico de 20 kV/cm y 1/2 MIC de orégano es suficiente para llegar a inactivar la mayor parte de la población microbiana de esta cepa de *L. monocytogenes*. Los PEAV potencian el efecto del orégano en las células dañadas.

5. AGRADECIMIENTOS

Investigación apoyada por el MICINN (es) y FEDER a través de los proyectos AGL2017-86840-C2-1-R y AGL2016-82014-REDT.

6. REFERENCIAS

- [1] Buchanan, R.L., Gorris, L.G., Hayman, M.M., Jackson, T.C., Whiting, R.C., 2017. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control* 75, 1–13.
- [2] Álvarez, I., Pagán, R., Condón, S., Raso, J., 2003. The influence of process parameters for the inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. *Int. J. Food Microbiol.* 87, 87–95.
- [3] Amiali, M., Ngadi, M.O., Smith, J.P., Raghavan, G.S.V., 2007. Synergistic effect of temperature and pulsed electric field on inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enteritidis* in liquid egg yolk. *J. Food Eng.* 79, 689–694.

- [4] Grahl, T., Märkl, H., 1996. Killing of microorganisms by pulsed electric fields. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, 148–157.
- [5] Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, R.M., Martín-Belloso, O., 2008. Non-thermal pasteurization of fruit juices by combining high-intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 9, 328–340.
- [6] Wan, J., Coventry, J., Swiergon, P., Sanguansri, P., Versteeg, C., 2009. Advances in innovative processing technologies for microbial inactivation and enhancement of food safety–pulsed electric field and low-temperature plasma. *Trends Food Sci. Technol.* 20, 414–424.
- [7] Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A., Cliver, D.O., 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21, 1199–1218.
- [8] Maza, M., Martínez Rodríguez, J.M., Saldaña, G., Ballesteros, F., Álvarez, I., Raso, J., 2017. Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEF), una tecnología innovadora en el proceso de elaboración de vinos.

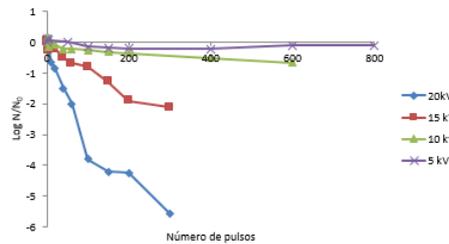


Figura 1 Relación de la fracción de supervivientes para en distintos campos eléctricos.

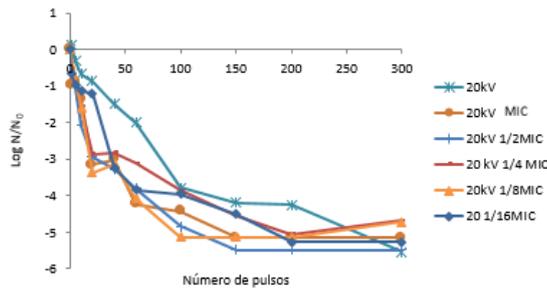


Figura 2 Relación de la fracción de supervivientes a distintas concentraciones de orégano a 20 kV/cm.

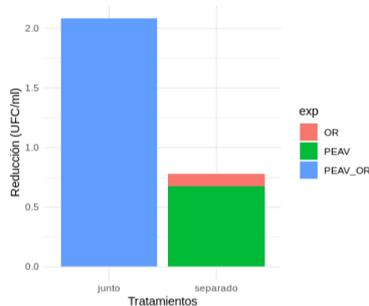


Figura 3 Sinergia entre los tratamientos conjuntos y los tratamientos por separado para 10 pulsos a 20 kV/cm.

ORAL SESSION II:
Plant Production
Technology and
Engineering

Functional and structural soil regeneration in abandoned mine tailings from semiarid Mediterranean areas: relationships with spontaneous plant colonization

Regeneración funcional y estructural del suelo en depósitos mineros abandonados de ambientes mediterráneos semiáridos y su relación con la colonización vegetal espontánea

A. Peñalver-Alcalá^{1*}, J. Álvarez-Rogel¹, M.N. González-Alcaraz²

¹Departamento de Ingeniería Agronómica. Área de Edafología y Química Agrícola. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica-UPCT. Paseo Alfonso XIII, 48, Cartagena, 30203 Murcia. Spain

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

*antonio.penalver@upct.es

Abstract

Terrestrial ecosystems degraded by mine waste with functional and structural characteristics deteriorated, can present stressful conditions to organisms, also to mean a transfer risk of potentially toxic compounds to environment. The aim of this study was to assess the soil development, structural and functional, associated to different spontaneous plant colonization stages related with ecosystem regeneration, in Mediterranean environments affected by mine waste. Structural (structure; pH; salinity; total organic carbon; total nitrogen; metals) and functional (microbial biomass carbon; β -glucosidase activity; functional groups of microorganisms study) soil parameters were evaluated in five degraded environments with different plant colonization stage, as well as, a control forest without pollution. Structural and functional differences between environments were observed, with soil properties and functional response of ecosystems closer to control forest in the environments with higher plant colonization.

Keywords: metallic contamination; biogeochemical cycles; ecosystem services; soil ecology.

Resumen

Los ecosistemas terrestres degradados por residuos mineros, cuyas características funcionales y estructurales están deterioradas, pueden presentar condiciones estresantes para los organismos vivos, además de suponer un riesgo de transferencia de compuestos potencialmente tóxicos al medio. El objetivo de este trabajo fue evaluar el desarrollo edáfico, estructural y funcional, del suelo asociado a distintas etapas de colonización vegetal espontánea, relacionados con la regeneración del ecosistema, en ambientes Mediterráneos afectados por residuos mineros. Se evaluaron diversos parámetros estructurales (estructura; pH; salinidad; carbono orgánico total; nitrógeno total; metales) y funcionales (carbono de la biomasa microbiana; la actividad β -glucosidasa; el estudio de grupos funcionales de microorganismos) del suelo de cinco ambientes degradados con diferente grado de colonización vegetal, además de en un bosque control sin contaminación. Se observó que existen diferencias estructurales y funcionales entre

ambientes, con propiedades del suelo y respuestas funcionales de los ecosistemas más próximas a las del bosque control en los ambientes con mayor colonización vegetal.

Palabras clave: contaminación metálica; ciclos biogeoquímicos; servicios ecosistémicos; ecología de suelos.

1. INTRODUCCIÓN

La minería metálica es una de las actividades que causa mayores impactos ambientales, ya que destruye el paisaje y genera residuos potencialmente peligrosos por contener elevados contenidos en metal(oid)es. En muchas ocasiones estos residuos se almacenan en balsas o depósitos que permanecen “in situ” en las antiguas zonas mineras tras el cese de la actividad, suponiendo un foco potencial de dispersión de sustancias potencialmente tóxicas [1]. Además, estos depósitos mineros abandonados presentan condiciones desfavorables (p.e. pHs extremos, elevada salinidad, elevadas concentraciones de metales, escasez de nutrientes, etc.) para la biota, lo que dificulta la recuperación del ecosistema [2]. Dicha recuperación implica una regeneración funcional (p.e. ciclos biogeoquímicos y propiedades relacionadas) y estructural (tipos de organismos/microorganismos) del sistema suelo-planta que favorezca la provisión de servicios ecosistémicos (p.e. retención de contaminantes, mantenimiento de la biodiversidad, secuestro de carbono, etc.). Trabajos recientes han observado la mejora de las propiedades edáficas en depósitos mineros abandonados colonizados espontáneamente por la vegetación [p.e. 3]. Sin embargo, no se conoce en detalle cómo estos fenómenos modifican las características funcionales y estructurales de los suelos y sus relaciones con la vegetación colonizadora.

El objetivo general del presente trabajo fue profundizar en el conocimiento funcional (propiedades físicas y biogeoquímicas incluyendo microbiología y mineralización de materia orgánica) de los nichos edáficos en ambientes Mediterráneos afectados por residuos de minería metálica y su relación con la colonización vegetal, para contribuir a comprender el papel del suelo como soporte de la regeneración natural espontánea del ecosistema.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El área de estudio se localiza en el Distrito Minero de La Unión-Cartagena, Murcia, SE de España, con un clima Mediterráneo semiárido (precipitaciones medias anuales ~200-300 mm, temperatura media anual ~17°C, y tasas medias anuales de evapotranspiración ~860mm). Se establecieron parcelas de 4m² (n=4) para el estudio de seis ambientes. Cuatro de ellos corresponden a zonas espontáneamente colonizadas por la vegetación dentro de dos depósitos mineros abandonados hace unos 20-25 años y los otros dos a zonas fuera de dichos depósitos. En los depósitos se estudiaron: 1. Zonas sin vegetación (S); 2. Individuos aislados de *Pinus halepensis* (P); 3. Individuos aislados de *P. halepensis* bajo los que crecen hierbas y matorrales (I); y 4. Grupos de individuos de *P. halepensis* que forman pequeños bosquetes con hierbas y matorrales (G). Fuera de depósitos mineros se estudiaron: 5. Bosque de *P. halepensis* afectado por residuos mineros (A); 6. Bosque de *P. halepensis* no afectado por residuos mineros (zona control, C).

En cada uno de los ambientes se identificaron las plantas presentes y se determinó el índice de diversidad de Shannon-Weaver como indicador de la riqueza de especies vegetales.

En los suelos de cada ambiente se analizaron los siguientes parámetros: estructura [4]; pH y salinidad (conductividad eléctrica, CE) en extracto 1:2,5; carbono orgánico total (COT) y nitrógeno total (NT) (analizador TOC-VCSH Shimadzu); metales extraíbles con acetato amónico 1N, considerados metales biodisponibles; metales totales (p.e. Pb, Zn) (fluorescencia de rayos-X en un analizador Bruker S4 Pioneer; carbono de la biomasa microbiana (CBM) [5]; actividad β-glucosidasa [6]; y actividad metabólica de los microorganismos del suelo (Biolog EcoPlate®) [7].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dentro de los depósitos mineros abandonados la riqueza de especies vegetales aumentó de forma gradual en el sentido P>I>G (Fig. 1), indicando un gradiente de menor a mayor complejidad estructural en la cubierta vegetal colonizadora. Fuera de los depósitos, se obtuvo mayor diversidad vegetal en A que en C. El hecho de que en los ambientes afectados por los residuos mineros hubiera mayor diversidad de especies puede deberse a que la alteración favorece a las especies oportunistas, que posteriormente tienden a desaparecer cuando el ecosistema se estabiliza.

Los contenidos de metal(oid)es totales de los suelos dentro de los depósitos mineros fueron muy similares entre sí y superiores a los suelos de fuera de los depósitos. Por ejemplo, para Pb y Zn (g kg^{-1}): **S:** $\text{Pb}_{\text{tot}} 5,3 \pm 0,4$; $\text{Zn}_{\text{tot}} 8,6 \pm 2,2$; **P:** $\text{Pb}_{\text{tot}} 7,9 \pm 0,2$; $\text{Zn}_{\text{tot}} 18 \pm 0,7$; **I:** $\text{Pb}_{\text{tot}} 14,0 \pm 0,8$; $\text{Zn}_{\text{tot}} 12 \pm 1$; **4. G:** $\text{Pb}_{\text{tot}} 10,0 \pm 0,2$; $\text{Zn}_{\text{tot}} 13,0 \pm 0,7$; **A:** $\text{Pb}_{\text{tot}} 8,6 \pm 0,1$; $\text{Zn}_{\text{tot}} 9,2 \pm 0,4$; **C:** $\text{Pb}_{\text{tot}} 1,3 \pm 0,2$; $\text{Zn}_{\text{tot}} 0,8 \pm 0,07$. Esto apunta a que la concentración total de metales no debe ser un factor decisivo para la diversidad vegetal dentro de los depósitos.

La colonización vegetal indujo el desarrollo edáfico, como muestra el paso progresivo de ausencia de estructura en S y de estructura migajosa en P a estructuras grumosas en I y G (Tabla 1). Una mayor diversidad vegetal estuvo también asociada con una menor salinidad, alcanzándose en el ambiente G valores de CE similares los de A y C (Figura 1; Tabla 1). En cuanto al Pb y Zn extraídos con acetato amónico (Tabla 1), los ambientes S y P tuvieron concentraciones claramente superiores al resto. Sin embargo, en I y G fueron similares y muy parecidas a los ambientes de fuera de los pantanos (A y C) (Tabla 1). A lo largo del gradiente P-I-G hubo un incremento de COT, NT, CBM, actividad β -glucosidasa y de la actividad metabólica de los microorganismos edáficos, aunque aún quedaron por debajo de los valores obtenidos en los ambientes A y C (Figura 1; Tabla 1). Estos resultados apuntan a que la evolución de la estructura del suelo, ligada al aumento de materia orgánica y actividad microbiana, favorecen el lavado de sales en el horizonte superficial del suelo y la disminución de la concentración de metales biodisponibles y eso, a su vez, puede favorecer el desarrollo de la vegetación y la aparición de nuevas especies generando una mayor diversidad.

4. CONCLUSIONES

Los resultados apuntan a que la colonización vegetal espontánea de los depósitos de residuos mineros de la Sierra de La Unión-Cartagena puede contribuir de forma efectiva a restaurar la diversidad vegetal y la funcionalidad del suelo, así como a disminuir los riesgos por la presencia de metal(oid)es.

5. AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por el Ministerio de Industria, Economía y Competitividad (CGL2016-80981-R) y por fondos FEDER y por Campus Mare Nostrum de Excelencia Internacional a través de su Ayuda para la realización de estancias externas de jóvenes investigadores asociados a redes y nodos CMN durante el curso académico 2018/2019.

6. REFERENCIAS

[1] Dudka S., Adriano D.C. 1997. Environmental impacts of metal ore mining and processing: a review. J. Environ. Qual. 26: 590-602.

[2] Wahl, J.J., Theron, P.D., Maboeta, M.S. 2012. Soil mesofauna as bioindicators to assess environmental disturbance at a platinum mine in South Africa. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 86: 250-260

[3] Párraga-Aguado I., Querejeta J.I., González-Alcaraz M.N., Jiménez-Cárceles F.J., Conesa H.M. 2014. Usefulness of pioneer vegetation for the phytomanagement of metal(loid)s enriched tailings: grasses vs. shrubs vs. trees. *J. Environ. Manage.* 133: 51-58.

[4] FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2006. *Guidelines for Soil Description*. fourth ed. (Rome).

[5] 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.

[6] Jiménez de Ridder P., Bonmatí Pont M. 2003. Determinación de la actividad β -glucosidasa del suelo. In: *Técnicas de Análisis de Parámetros Bioquímicos en Suelos: Medida de Actividades Enzimáticas y Biomasa Microbiana*, 1st ed, C. García, F. Gil, T. Hernández, C. Trasar, eds. (Ediciones Mundi-Prensa, Spain). Pp.169-183.

[7] Sofo A., Palese A.M., Casacchia T., Celano G., Ricciuti P., Curci M., Crecchio C., Xiloyannis C. 2010. Genetic, Functional, and Metabolic Responses of Soil Microbiota in a Sustainable Olive Orchard. *Soil Sci.* 175: 81-88.

Tabla 1. Parámetros edáficos por ambiente (Am) (medias \pm error estándar; n=4). pH y CE (dS m⁻¹) en extracto 1:2,5. Zn_{Ac} y Pb_{Ac}: Zn y Pb extraídos con acetato amónico (mg kg⁻¹). COT (g kg⁻¹); NT (g kg⁻¹); CBM (mg C kg⁻¹); β -gluc: actividad β -glucosidasa (μ mol g⁻¹ h⁻¹). n.d.=no detectado.

Am	Estructura	pH	CE	Zn _{Ac}	Pb _{Ac}	COT	NT	CBM	β -gluc
S	Sin estructura con tendencia a laminaciones	6,4 \pm 0,4	6,3 \pm 1,3	238 \pm 46	452 \pm 113	2,8 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	11,5 \pm 2,3	n.d.
P	Migajosa (>50 mm)	7,6 \pm 0,1	2,3 \pm 0,1	500 \pm 101	191 \pm 19	5,7 \pm 1,0	0,3 \pm 0,1	132 \pm 16	0,4 \pm 0,1
I	Laminar con tendencia grumosa (20-50 mm)	7,5 \pm 0,3	2,0 \pm 0,3	67 \pm 11	16 \pm 4	13,3 \pm 1,5	0,7 \pm 0,1	263 \pm 49	1,5 \pm 0,3
G	Laminar con tendencia grumosa (>50 mm)	7,9 \pm 0,1	1,3 \pm 0,4	139 \pm 28	9 \pm 1	12,7 \pm 2,4	0,7 \pm 0,1	292 \pm 20	1,0 \pm 0,3
A	Grumosa (20-50 mm) y granular (>10 mm)	7,8 \pm 0,2	0,5 \pm 0,0	142 \pm 11	18 \pm 1	47,6 \pm 4,5	2,1 \pm 0,2	597 \pm 55	2,3 \pm 0,3
C	Grumosa (20-50 mm) y angular blocosa (10-20 mm)	7,5 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	24 \pm 4	15 \pm 4	107 \pm 6	4,7 \pm 0,1	1489 \pm 248	2,1 \pm 0,2

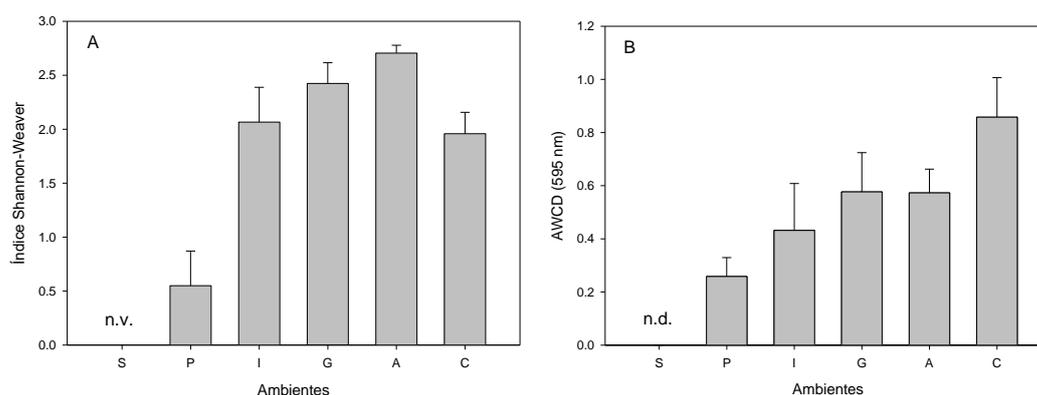


Figura 1. A: Índice de Shannon-Weaver (medias \pm error estándar; n=4). n.v.= no vegetación; B: Actividad metabólica de microorganismos del suelo (AWCD) (medias \pm error estándar; n=4) n.d.=no detectado.

LED lighting for indoor cultivation of basil

G. Pennisi^{1,2,3*}, A. Pistillo¹, S. Nicola², F. Orsini¹, G. Gianquinto¹, J.A. Fernández³

¹DISTAL – Department of Agricultural and Food Sciences and Technologies, Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Bologna. Italy

²DISAFA-VEGMAP, Department of Agricultural, Forest and Food Sciences, University of Turin, Turin. Italy

³Department of Agronomical Engineering, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, Cartagena. Spain

*giuseppina.pennisi@unibo.it

Abstract

Indoor cultivation systems are gaining importance worldwide, thanks to their greater efficiency in the use of resources (water, land and nutrients). The limiting factor for these systems is the illumination costs that are still high. In this context, LEDs (light emitting diodes) are gaining attention because of their ability to provide the required light spectra, and high electricity use efficiency. The goal of this study is to identify the role played by red:blue (R:B) ratio on the resource use efficiency of indoor basil cultivation, linking the light physiological response to changes in yield and nutritional properties. Basil plants were cultivated in growth chamber under 5 different R:B ratio LED lighting regimens (respectively, RB_{0.5}, RB₁, RB₂, RB₃, and RB₄), using fluorescent lamps as control (CK₁). For the six light treatments, a PPFD of 215 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a photoperiod of 16/8 light/dark per day were provided. Greater biomass production was associated with LEDs lighting as compared with fluorescent lamp, with best performances observed using RB \geq 2. Adoption of RB₂ and RB₃ improved also the plant's capacity to transform resources, resulting in greatest water, land and energy use efficiency. Nutrient use efficiency was increased by using LED lights with a greater portion of blue light in the spectrum. Decreasing R:B ratio also increased leaf stomatal conductance. Plant grown under RB₃ showed the best antioxidant properties in terms of flavonoid content and FRAP as compared to the other light treatments. From this study it can be concluded that a R:B ratio of 3 (RB₃) provides optimal growing conditions for indoor cultivation of basil.

Keywords: *Ocimum basilicum* L.; water use efficiency (WUE); energy use efficiency (EUE); land surface use efficiency (SUE); nutrient use efficiency (NUE).

1. INTRODUCTION

One of the most important challenges for agriculture in the next 50 years will be the provision of food to feed ever larger cities with ever fewer resources. To face this scenario, new forms of agriculture, not dependent on arable land, are gaining increasing popularity [1]. This are indoor plant production system where environmental factors are controlled, minimizing the interaction with the external climate. They are known as Plant Factories with Artificial Lighting (PFALs) or Vertical Farms with Artificial Lighting (VFALs). Thanks to the possibility of developing cultivation on the vertical dimension by using multiple overlapping layers, the adoption of hydroponics systems, the opportunity to recover water loss for transpiration by plants, the recirculation of nutrient solution, indoor cultivation systems improve use efficiency of land, water, and nutrients [1-3]. On the other hand, the large use of energy for illumination, cooling, heating, and dehumidification, is limiting the diffusion of these systems [4].

Red and blue wavebands in the spectrum are considered the most important energy sources for photosynthetic CO₂ assimilation [5], but the appropriate balance between red and blue

components in the light spectrum for indoor cultivation of leafy vegetables and herbs remains unclear.

The aim of this study is to identify the best red:blue (R:B) LEDs light ratio for biomass production, antioxidant capacity, and gas exchanges parameters of sweet basil indoor cultivation paying particular attention on how light quality can affect the use efficiency of the supplied resources (e.g., space, water, nutrients, energy).

2. MATERIALS AND METHODS

Four experiments were conducted in six separate compartments of a climate-controlled growth chamber (air temperature $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 55–70% relative humidity and 450 ppm CO_2) at the University of Bologna. Basil seeds (*Ocimum basilicum* cv. Superbo, Sais seeds) were germinated under fluorescent lamps (CK₁, TL-D 90 De Luxe 58W, Philips) and, when plants reached the two true leaf stage, roots were washed and plantlets were transplanted into individual hydroponic system (100 plants m^{-2}). Upon transplanting, six light treatments were applied: 5 different R:B ratio LED lighting regimens (respectively, RB_{0.5}, RB₁, RB₂, RB₃, and RB₄, Flytech), and a fluorescent lamps as control (CK₁, see specs above). Plants were grown under artificial light only with a photosynthetic photon flux density (PPFD) of $215 \pm 5.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a photoperiod of 16/8 h of light/dark. Full randomisation of light treatments was operated before each experiment. Each experiment was closed when commercial harvest was reached, at 18 Days After light Treatment (DAT), which meant 39 Days After Sowing (DAS).

At harvest time, for all experiments, edible fresh weight (FW) and water use for each plant were measured. Water Use Efficiency (WUE), as the ratio between FW and the volume of water used ($\text{g FW L}^{-1} \text{H}_2\text{O}$) was calculated. Lighting Energy Use Efficiency (EUE) was determined according to the crop cycle length and the final FW, related to the lamps' cumulated electricity absorption (g FW kW^{-1}). Land Surface Use Efficiency (SUE) was determined by analysing the potential achievable yield per unit land surface (1 m^2 , with plant density of 100 plants m^{-2}) over a year. Crop Nutrient Use Efficiency (NUE) was calculated by the ratio between FW and the total concentration of selected nutrients (N, P, K, Ca, Mg, Fe), analysed in leaf tissues.

Measurements of stomatal conductance ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) were carried out on the third fully expanded leaf from the apex using a leaf porometer (AP4, Delta-T Devices). Leaf chlorophyll content was estimated using a hand-held leaf chlorophyll meter (N-Tester, Yara) on the third fully expanded leaf from the apex. For the determination of total phenolic, flavonoid content and total antioxidant capacity, an extraction of the phenolic compound was performed twice on frozen samples of basil leaves. Total phenolic content (TPC) was determined according to the Folin-Ciocalteu colorimetric method [6], while total flavonoids content (TFC) was determined by aluminium chloride colorimetric assay [6]. Total antioxidant capacity was measured by Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay [6]. Micro- and macro-nutrient concentrations were measured in basil leaves collected at harvesting. Micro- and macronutrients analyses were performed by using an inductively coupled plasma optical emission spectrometer ICP-OES equipped with a plasma source and an optical detector with a charge-coupled device CCD (SPECTRO Analytical Instruments GmbH & Co.) [6]. Total nitrogen (TN) analysis were performed in dry leaf samples by using a thermo-electron CHNS-O elemental analyser.

Data were analysed by two-way ANOVA (light spectrum x experiment) and the means were compared by Least Significance Difference (LSD), at 5% significance level.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Considering that no significant interactions between light and experiments were found, average values from the four experiments were used.

Basil FW was enhanced by the increasing RB ratio, reaching the highest values at RB \geq 2 (Table 1). Yield reduction under prevalent blue light was also previously reported [7], due to lower internode growth and smaller plant canopy. A consistent trend in plant chlorophyll content was also evident, with the highest values found when plants were grown at RB \geq 3 (Table 1). Water use per plant varied from 0.34 (RB₁ and CK₁) to 0.42 (RB_{0.5} and RB₄) and 0.48 (RB₂ and RB₃) L plant⁻¹ (data not shown). Considering the plant capacity to transform resources, WUE was the greatest in plants grown under RB ratio of 2 or 3 (average value of 44.5 \pm 1.2 g FW L⁻¹ H₂O), thanks to a higher biomass production despite a slight increase in water use. A greater presence of blue light in the spectrum resulted in higher stomatal conductance (Table 1), as previously reported in other researches [8], due to the action on phototropins, which regulate stomata opening.

Light energy used was highest in CK₁ as compared with LED treatments, and, among LEDs treatments, an increase in electricity consumption was associated with the increase in the red portion of the spectrum (data not shown). As a consequence of the increased biomass, EUE was highest with RB \geq 2 (average value of 32.7 \pm 1.0 g FW kW⁻¹).

Land surface use efficiency was highest when plants were grown with RB \geq 2 (Table 1). When using a vertical system of 5 or 10 layers, daily yield per surface of land occupied would increase up to, respectively, 567 and 1135 g m⁻² day⁻¹, if RB \geq 2 were used (data not shown). These results are very interesting if compared with previous average growth rate of about 24–110 g m⁻² day⁻¹ recorded in traditional greenhouse production [9-10].

Based on the overall mineral content per plant, N, P, K, Ca, Mg, and Fe were the highest in RB₃. From a resource use perspective, NUE was the lowest when CK₁ or LED lights with RB \geq 2 were used, and this was associated with higher concentration in leaf tissue of the elements.

The highest FRAP values were found in plant grown under RB₂, although with comparable values to RB \geq 3 (Table 1). Total flavonoid content was highest in RB₃ (1.60 mg CE g⁻¹ FW) (Table 1). No statistical differences in polyphenols content were observed in response to R:B ratio (data not shown). If the increased antioxidant capacity and flavonoids concentrations are combined with the observed yield increase associated with RB₂ and RB₃, the number of functional compounds achievable per plant is far greater compared with the other treatments. These results are similar to those found in previous researches [11], where red light was also shown to improve antioxidant capacity in basil.

4. CONCLUSION

A R:B ratio of 3 allowed to achieve highest yield, quality and resources use efficiency. At RB₃ a reduction in stomatal conductance combined with preserved plant growth resulted in increased water use efficiency. Concurrently, the higher yield associated with RB₃ resulted in greater energy use efficiency. Starting from the promising results associated with RB₃, future researches should target the effect of additional spectral regions, the identification of crop intra- and inter-specific variability in the response, or the definition of optimal light intensities.

5. REFERENCES

- [1] Kalantari, F., Mohd Tahir, O., Mahmoudi Lahijani, A., Kalantari, S. 2017. A review of vertical farming technology: a guide for implementation of building integrated agriculture in cities. *Adv. Eng. Forum* 24: 76–91.
- [2] Kozai, T., Niu, G. 2016. Plant factory as a resource-efficient closed plant production system. In: *Plant Factory: An Indoor Vertical Farming System for Efficient Quality Food Production*, 1st ed. T. Kozai, G. Niu, and M. Takagaki, eds. (Academic Press, Cambridge, MA, U.S.A.). Pp.69–90.

- [3] Dou, H., Niu, G., Gu, M., Masabni, J. G. 2018. Responses of sweet basil to different daily light integrals in photosynthesis, morphology, yield, and nutritional quality. *HortScience* 53: 496–503.
- [4] Graamans, L., Baeza, E., Van Den Dobbelsteen, A., Tsafaras, I., Stanghellini, C. 2018. Plant factories versus greenhouses: comparison of resource use efficiency. *Agric. Syst.* 160: 31–43.
- [5] Lin, K. H., Huang, M. Y., Huang, W. D., Hsu, M. H., Yang, Z. W., Yang, C. M. 2013. The effects of red, blue, and white light-emitting diodes on the growth, development, and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L. var. capitata). *Sci. Hortic.* 150: 86–91.
- [6] Pennisi, G., Blasioli, S., Cellini, A., Maia, L., Crepaldi, A., Braschi, I., Spinelli, F., Nicola, S., Fernandez, J.A., Stanghellini, C., Marcelis, L.F.M., Orsini, F., Gianquinto G. 2019. Unraveling the Role of Red:Blue LED Lights on Resource Use Efficiency and Nutritional Properties of Indoor Grown Sweet Basil. *Front. Plant Sci.* 10: 305.
- [7] Chen, X. L., Guo, W. Z., Xue, X. Z., Wang, L. C., Qiao, X. J. 2014. Growth and quality responses of ‘Green Oak Leaf’ lettuce as affected by monochromic or mixed radiation provided by fluorescent lamp (FL) and light-emitting diode (LED). *Sci. Hortic.* 172: 168–175.
- [8] Hogewoning, S. W., Trouwborst, G., Maljaars, H., Poorter, H., van Ieperen, W., Harbinson, J. 2010. Blue light dose-responses of leaf photosynthesis, morphology, and chemical composition of *Cucumis sativus* grown under different combinations of red and blue light. *J. Exp. Bot.* 61: 3107–3117.
- [9] Saha, S., Monroe, A., Day, M. R. 2016. Growth, yield, plant quality and nutrition of basil (*Ocimum basilicum* L.) under soilless agricultural systems. *Ann. Agric. Sci.* 61: 181–186.
- [10] Montesano, F. F., van Iersel, M. W., Boari, F., Cantore, V., D’Amato, G., Parente, A. 2018. Sensor-based irrigation management of soilless basil using a new smart irrigation system: effects of set-point on plant physiological responses and crop performance. *Agric. Water Manag.* 203: 20–29.
- [11] Samuolienė, G., Brazaitytė, A., Viršilė, A., Jankauskienė, J., Sakalauskienė, S., Duchovskis, P. 2016. Red light-dose or wavelength-dependent photoresponse of antioxidants in herb microgreens. *PLoS One* 11: e0163405.

Table 1. Fresh weight, water use efficiency (WUE), Energy Use Efficiency (EUE), land Surface Use Efficiency (SUE), nutrient use efficiency (NUE) chlorophyll content, stomatal conductance, FRAP and flavonoids concentrations of basil plants grown under LED lights with different R:B ratio in the spectrum (RB_{0.5}, RB₁, RB₂, RB₃, and RB₄) or under fluorescent lamps (CK₁). Different letters indicate significant differences at P ≤ 0.05.

		RB _{0.5}		RB ₁		RB ₂		RB ₃		RB ₄		CK ₁	
Fresh weight	g plant ⁻¹	12.4	c	13.3	b	20.5	a	21.5	a	19.3	a	14.7	bc
WUE	g FW L ⁻¹ H ₂ O	32.6	c	38.5	b	43.6	ab	45.4	a	40.9	b	40.6	b
EUE	g FW kW ⁻¹	27.9	b	26.9	b	33.7	a	33.2	a	31.1	a	13.2	c
SUE	g FW m ⁻² d ⁻¹	68.9	c	74.1	b	113.7	a	119.4	a	107.5	a	81.4	bc
NUE	g FW g ⁻¹ nutrients	186.1	a	179.0	a	165.5	b	154.9	b	163.3	b	165.2	b
Chorophyll content	N-tester value	408.9	c	437.3	c	496.4	b	546.0	a	527.9	ab	431.5	c
Stomatal conductance	mmol m ⁻² s ⁻¹	210.1	a	179.2	ab	147.5	b	139.6	b	159.7	b	160.1	b
FRAP	mmol Fe ²⁺ kg ⁻¹ FW	0.7	b	0.7	b	1.1	a	1.0	ab	0.8	ab	0.7	b
Flavonoids concentration	mg CE g ⁻¹ FW	1.0	c	1.2	bc	1.3	b	1.6	a	0.9	c	0.9	c

Carbamates synergize the toxicity of acrinathrin in resistant western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae)

Los carbamatos sinergizan la toxicidad del acrinatrín en poblaciones resistentes del trips occidental de las flores (Thysanoptera: Thripidae)

J. Abellán*, E. Fernández, C. Grávalos, P. Bielza

Departamento de Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena. Spain

*jaimeabellan@hotmail.com

Abstract

The insecticidal efficacy of mixtures of acrinathrin (pyrethroid) with carbamate fungicides (propamocarb, carbendazim, iprovalicarb and diethofencarb) and insecticides (carbaryl, thiodicarb, pirimicarb and oxamyl) was studied in a field strain of *Frankliniella occidentalis* (Pergande). The method consisted of combining increasing concentrations of acrinathrin with a constant sublethal rate of the carbamate as synergist. These carbamates (carbendazim, iprovalicarb and diethofencarb) did not show synergism to acrinathrin in a laboratory insecticide-susceptible strain, but they did in two field strains, with higher acrinathrin resistance corresponding to higher synergism. Carbamates such as pirimicarb, oxamyl and propamocarb could be practical candidates for field use as synergists, even against other pests with metabolic resistance.

Keywords: *Frankliniella occidentalis*; insecticide-resistance; synergism; insecticide-mixtures.

Resumen

La eficiencia insecticida de las mezclas de acrinatrín (piretroide) con fungicidas carbamatos (propamocarb, carbendazima, iprovalicarb y dietofencarb) e insecticidas (carbaril, tiodicarb, pirimicarb y oxamilo) se estudió en una población de campo de *Frankliniella occidentalis* (Pergande). El método consistió en combinar concentraciones crecientes de acrinatrín con una tasa constante subletal del carbamato como sinergista. Estos carbamatos (carbendazima, iprovalicarb y dietofencarb) no mostraron sinergismo al acrinatrín en una población de laboratorio susceptible al insecticida, pero sí lo hicieron en dos poblaciones de campo, mostrando una mayor resistencia al acrinatrín debido a un mayor sinergismo. Carbamatos como el pirimicarb, el oxamilo y el propamocarb podrían ser candidatos prácticos para su uso en campo como sinergistas, incluso contra otras plagas con resistencia metabólica.

Palabras clave: *Frankliniella occidentalis*; resistencia insecticida; sinergismo; mezcla de insecticida.

1. INTRODUCCIÓN

El trips occidental de las flores, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), es una de las mayores plagas de hortalizas, frutales y cultivos ornamentales en áreas de producción con clima cálido. Muchas poblaciones de *F. occidentalis* han mostrado resistencia a una serie de diferentes insecticidas. Su facilidad a desarrollar resistencia cruzada a los insecticidas del mismo grupo químico y a aquellos de otras clases sugiere la existencia de un mecanismo de resistencia metabólico. Diferentes mecanismos de resistencia hacia diferentes insecticidas contribuyen a la resistencia. Sin embargo, un estudio reciente sugiere que el principal mecanismo de resistencia a la mayoría de insecticidas en *F. occidentalis* es metabólico, suprimible con butóxido de piperonilo, mediado con citocromo P450 monooxigenasas y generador de resistencia cruzada entre diferentes clases de insecticidas [1,2].

Dado el desarrollo de la resistencia en *F. occidentalis* se llevó a cabo una investigación sobre las diferentes combinaciones del acrinatrín con diferentes carbamatos (tanto insecticidas como fungicidas) estudiando el efecto sinergista entre ellos en poblaciones susceptibles y resistentes seleccionadas en laboratorio.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Insectos

La población susceptible (MLFOM) de *F. occidentalis* se recogió en 2001 de un cultivo ecológico de melocotonero situado en una zona (Murcia, sureste de España) de cultivos frutícolas donde no había mucho uso de insecticidas. Las poblaciones de campo TFE2 y RAMBLA fueron recogidas en 2005, de cultivos de pimiento dulce en Murcia y Almería, respectivamente. Se mantuvieron en el laboratorio con fotoperiodo 16:8, temperatura constante de 25°C. [3-5].

2.2 Pesticidas

Las formulaciones comerciales de los diferentes pesticidas usados para los bioensayos fueron: Rufast avance (acrinatrín 7,5%, Agrodan), Sarvin 85 (carbaril 85%, Sarabia), Proplant (propamocarb 60,5%, IQV) Quimuzin 50 (carbendazima 50%, Sarabia), Powmyl (ditiofencarb 25%, Kenogard), Securex (tiodicarb 37,5%, Bayer CropScience), Boing (pirimicarb 50%, Sarabia), Melody Combi (folpet 37,5% + Iprovalicarb 6%, Bayer CropScience) y Vydate 10 L (oxamilo 10%, DuPont).

2.3 Bioensayos

Se utilizaron bioensayos residuales para ensayar la resistencia del adulto a cada pesticida en la población seleccionada correspondiente. Solo se usaron trips hembras. Se introdujeron secciones de hoja en viales de plástico individuales (5 mL) 10 adultos por repetición. Para el monitoreo preliminar de la actividad sinérgica, la población de campo de *F. occidentalis* (TFE2) se expuso al insecticida carbamato solo y mezclado con acrinatrín. Una concentración diagnóstico (dosis máxima de campo, DMC), más un control (sin insecticida). Se ensayó para cada carbamato en tres repeticiones de 30 adultos de trips por dosis.

Tres de los carbamatos (pirimicarb, oxamilo y propamocarb) se seleccionaron para estudios más específicos sobre su acción sinérgica. Seis concentraciones, más un control (sin insecticida), se ensayaron para cada población (MLFOM, TFE2 y RAMBLA) en tres repeticiones de 10 trips adultos por dosis. Se usaron concentraciones subletales constantes de carbamatos como sinergistas. El oxamilo se usó al 25% de la DMC para reducir la mortalidad del sinergista solo. El pirimicarb y el propamocarb se usaron a la DMC. Las concentraciones sinergistas fueron 500 ppm para el oxamilo y el pirimicarb y 1815 ppm para el propamocarb. Se escogieron concentraciones de acrinatrín para proporcionar un rango de mortalidad del 0-100%. La mortalidad se evaluó después de 24 horas, los individuos inmóviles se contaron como muertos.

2.4 Análisis de Datos

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

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos de la mortalidad del monitoreo preliminar de la población de campo de *F. occidentalis* expuesta a carbamatos y en mezcla con acrinatrín se muestran en la tabla 1. La población de campo (TFE2) resultó moderadamente insensible al acrinatrín, mostrando una mortalidad a la dosis de campo (60 ppm de ingrediente activo, i.a.) del 33,3%. La mortalidad a la dosis de campo para todos los fungicidas carbamatos evaluada fue cero, excepto para la carbendazima, que fue del 8,9%. La mortalidad a la dosis de campo para los insecticidas carbamatos varió desde el 0% (carbaril y pirimicarb) al 5,6% (oxamilo). La mayoría de los fungicidas carbamatos no causaron efecto sinérgico alguno del acrinatrín en la población de campo, a excepción del propamocarb, el cual incremento la toxicidad del acrinatrín 2,5 veces, elevando la mortalidad del 33,3 al 82,2%. De entre los insecticidas carbamatos probados, solo el pirimicarb y el oxamilo produjeron un efecto sinergista con el acrinatrín. El sinergismo con el pirimicarb fue leve, elevando la mortalidad del acrinatrín al 67,7%. Sin embargo, el sinergismo del oxamilo fue mayor, elevando la mortalidad al 96,7%, restaurando casi completamente la susceptibilidad de *F. occidentalis* al acrinatrín.

El fungicida propamocarb y los insecticidas pirimicarb y oxamilo se seleccionaron para estudios más específicos sobre su acción sinérgica en bioensayos más detallados. Los resultados de los bioensayos de *F. occidentalis* con el acrinatrín solo y mezclado con los pesticidas seleccionados se muestran en la tabla 2. La población de campo TFE2 de Murcia fue ligeramente resistente al acrinatrín (FR50=18,1) y la concentración letal (CL50) resultó ser significativamente diferente de la de la población susceptible (MLFOM). En cambio, la población de campo de Almería (RAMBLA) fue altamente resistente al acrinatrín (FR50=161,6). Ninguno de los carbamatos probados causó un efecto sinergista relevante con el acrinatrín en la población susceptible del laboratorio (MLFOM). Al igual que en el monitorio preliminar, los carbamatos produjeron un efecto sinergista con el acrinatrín en la población de campo TFE2. El sinergismo al nivel CL50 con el pirimicarb fue leve (RS50=3,5), moderado con el propamocarb (RS50=9,2) y alto con el oxamilo (RS50=16,6). En la población más resistente de Almería (RAMBLA), los ratios de sinergismo fueron más altos, RS50=7,1 para el pirimicarb, 14,1 para el propamocarb y 33,6 para el oxamilo.

El presente estudio muestra las interacciones sinergistas entre el piretroide acrinatrín e insecticidas carbamatos como el pirimicarb y el oxamilo, y fungicidas como el propamocarb. Este resultado es, bajo nuestro punto de vista, el primero en documentar la sinergia de estos carbamatos con un insecticida piretroide, y el primer sinergismo de insecticidas con fungicidas carbamatos.

4. CONCLUSIONES

Los datos presentes indican que algunos carbamatos sinergizan la eficiencia del acrinatrín. Como resultado, mezclas de acrinatrín con estos carbamatos pueden ser usados bajo condiciones de campo. Estas mezclas ofrecen interesantes posibilidades para prevenir el desarrollo de resistencias. El uso de sinergistas, aunque no permitirá detener o prevenir completamente el comienzo de resistencia a insecticidas, sí que podría retrasar su evolución. La presión de selección ejercida por un insecticida se verá reducida por el uso de mezclas con un sinergista. Nuestros estudios muestran que carbamatos tales como el pirimicarb, el oxamilo y el propamocarb son candidatos prácticos para su uso como sinergistas para controlar *F. occidentalis* y potencialmente otras especies de plagas donde la resistencia sea metabólica

5. REFERENCIAS

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

Tabla 1. Ratios de mortalidad y sinergismo del acrinatrín y diferentes carbamatos, solos o en mezcla con acrinatrín con una población de campo (TFE2) de *Frankliniella occidentalis*.

Pesticida	Concentración (i.a. ppm)	Mortalidad (% medio \pm SE)		Ratio de sinergismo
		Sinergista solo	Acrinatrín + Sinergista	
Acrinatrín	60		33,3 \pm 1,2	
Carbendazima	750	8,9 \pm 0,3	45,6 \pm 0,7	1,1
Dietofencarb	375	0,0 \pm 0,0	35,6 \pm 1,9	1,1
Iprovalicarb (+ folpet)	150 (+937,5)	0,0 \pm 0,0	27,8 \pm 0,9	0,8
Propamocarb	1815	0,0 \pm 0,0	82,2 \pm 0,9	2,5
Carbaril	1700	0,0 \pm 0,0	41,1 \pm 1,2	1,2
Oxamilo	2000	5,6 \pm 0,3	96,7 \pm 0,6	2,7
Pirimicarb	500	0,0 \pm 0,0	67,8 \pm 0,9	2,0
Tiodicarb	9,375	1,1 \pm 0,3	30,0 \pm 1,7	0,9

Tabla 2. Pendientes, concentraciones letales, factores de resistencia, y ratios de sinergismo del acrinatrín, con y sin sinergistas, contra las poblaciones susceptible (MLFOM) y de campo (TFE2 y RAMBLA) de *Frankliniella occidentalis*.

Población	Tratamiento	Pendiente (\pm SE)	CL50 (ppm) (95% CL)	FR50 (95% IC)	RS50 (95% IC)
°FOM	Acrinatrín	1,29 (\pm 0,16)	6,7 (4,2 - 10,8)	1,0	
	+Propamocarb	1,08 (\pm 0,18)	14,3 (6,7 - 27,0)	1,0	0,5 (0,2 - 1,0)
	+Pirimicarb	1,00 (\pm 0,16)	7,0 (3,4 - 12,5)	1,0	1,0 (0,4 - 2,1)
	+Oxamilo	0,90 (\pm 0,18)	6,7 (0,6 - 21,7)	1,0	1,0 (0,4 - 2,8)
TFE2	Acrinatrín	1,00 (\pm 0,16)	122,4 (55,3 - 233,6)	18,1 (8,7 - 37,7)	
	+Propamocarb	1,69 (\pm 0,34)	13,2 (6,8 - 20,8)	0,9 (0,5 - 1,8)	9,2 (4,2 - 20,2)
	+Pirimicarb	1,23 (\pm 0,21)	35,0 (18,4 - 67,2)	5,0 (2,6 - 9,6)	3,5 (1,6 - 7,5)
	+Oxamilo	0,60 (\pm 0,19)	7,4 (0,4 - 21,0)	1,1 (0,3 - 4,6)	16,6 (3,7 - 73,0)
RAMBLA	Acrinatrín	1,21 (\pm 0,37)	1086,3 (347,8 - 1897,0)	161,6 (74,1 - 352,5)	
	+Propamocarb	1,28 (\pm 0,27)	76,8 (43,7 - 145,5)	5,4 (2,6 - 10,9)	14,1 (7,0 - 28,8)
	+Pirimicarb	1,15 (\pm 0,31)	152,6 (73,4 - 1072,9)	21,9 (9,6 - 49,8)	7,1 (3,1 - 16,2)
	+Oxamilo	1,22 (\pm 0,23)	32,3 (16,2 - 58,3)	4,8 (2,3 - 10,2)	33,6 (16,0 - 70,8)

Application of compost tea in the production of baby leaf lettuce in floating trays

Aplicación de té de compost en la producción de lechuga *baby leaf* en bandejas flotantes

A. Giménez^{1*}, J.A. Fernández¹, C. Egea-Gilabert¹, J.A. Pascual²

¹Dpto. Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT), Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena. Spain

²Dpto. Conservación de Suelos y Agua y Manejo de Residuos Orgánicos. CEBAS-CSIC, Campus de Espinardo, E-30100-Murcia. Spain

*almudena.gimenez@upct.es

Abstract

The compost tea is being used as extra contribution of nutrients for its positive effects on crops. The objective of this work was to study the effect of the application mode of a compost tea on the production and quality of lettuce grown in a floating system in a pathosystem *Pythium irregulare*-lettuce. To that end, a cultivar of lettuce *baby leaf* red 'Antoria' was used in a floating system using styrofloat trays. A compost tea was added to the nutrient solution contained in the flotation beds or applied to plants (grown in the same nutrient solution) by microsprinkler. A solution of *Pythium irregulare* was added to the water on the flotation beds. Harvesting took place at 25 days after sowing. The application of compost tea to the nutrient solution in the absence of the pathogen had the highest yield. On the other hand, the application of compost tea by microsprinkler both in the absence and in the presence of the pathogen reduced the nitrate content. Therefore, the results indicate that the application of compost tea in the nutrient solution increases lettuce yield while its application by microsprinkler improves its quality.

Keywords: *Lactuca sativa* L.; yield; nutrient solution; microsprinkler.

Resumen

El té de compost está siendo utilizado como aporte extra de nutrientes por sus efectos positivos en los cultivos. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del modo de aplicación de un té de compost en el patosistema *Pythium irregulare*-lechuga sobre la producción y calidad de la lechuga cultivada en bandejas flotantes. Para ello, se sembró un cultivar de lechuga roja *baby leaf* 'Antoria' en bandejas *styrofloat*. El té de compost se añadió: A) a las mesas de flotación en la solución nutritiva y B) a través de riego con microaspersores. Una solución de *Pythium irregulare* se añadió al agua de las mesas de cultivo. La recolección se efectuó a los 25 días después de la siembra. La aplicación del té de compost en la solución nutritiva en ausencia del patógeno obtuvo un rendimiento mayor. Por otro lado, la aplicación del té compost por microaspersión, tanto en ausencia como en presencia del patógeno, redujo el contenido de nitratos. Por tanto, los resultados indican que la aplicación de té de compost a la solución nutritiva aumenta el rendimiento de la lechuga, y su aplicación por microaspersión mejora su calidad.

Palabras clave: *Lactuca sativa* L.; rendimiento; solución nutritiva; microaspersión.

1. INTRODUCCIÓN

El té de compost se obtiene a partir de compost maduros a través de diversos métodos de preparación [1], siendo un aporte externo de nutrientes para las plantas [2] y mejorando con ello el estado fisiológico de las mismas [3]. El té de compost puede ser aplicados tanto por vía foliar para prevenir enfermedades [1], como aplicado al sustrato con la solución nutritiva [4]. Para las hortalizas *baby leaf* producidas en bandejas flotantes la aplicación del té de compost tendría un efecto supresor contra *P. irregulare* [5], además de mejorar la calidad del producto final obteniendo un mayor rendimiento. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto del modo de aplicación de un té de compost en el patosistema *P. irregulare*-lechuga sobre la producción y calidad de la lechuga cultivada en un sistema de bandejas flotantes.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

El ensayo se realizó en la estación experimental agrícola “Tomas Ferro” de la UPCT (37º 41 'N; 0º 57' O). Se utilizó el cultivar de lechuga roja ‘Antoria’ de la casa Rijk Zwaan. La siembra se realizó el 3 de octubre de 2017 en bandejas "styrofloat" de 60 x 41 cm rellenas con un sustrato de turba comercial (Pindstrup). Las bandejas se introdujeron en una cámara climática a 18°C, 90% de humedad relativa y oscuridad durante 48 horas. A continuación, se pasaron a unas mesas de cultivo de dimensiones 1,35 x 1,25 x 0,2 m, ubicadas en un invernadero cubierto con polietileno térmico. Transcurrida una semana se realizó un aclareo de plántulas, dejando 8 por fisura (1600 plantas/m²). Al mismo tiempo, se aplicó la solución nutritiva (SN) al agua [6]. La duración del ciclo de cultivo fue de 25 días.

2.2 Sustratos orgánicos empleados

El compost utilizado para la producción de té de compost fue suministrado por CEBAS-CSIC. Las materias primas para el compostaje expresadas en peso seco fueron tomate (71%), cebolla (17%) y residuos de viñedo (12%). El té de compost se aplicó 3 dds, de dos formas: introduciendo unas bolsas de malla fina con 150 g de compost en la SN en cada mesa de flotación y en un tanque de riego con agua, a través de bolsas con un total de 450 g de compost, aplicándolo vía foliar por medio de microaspersores (MA).

2.3 Patógeno e inoculación

La solución de micelio de *Pythium irregulare* se obtuvo a partir de un inóculo infectivo crecido en placa Petri de patata dextrosa agar a 28°C durante 7 días. Esta se aplicó a los 5 dds a una dosis de $2,6 \times 10^3$ copias ITS del patógeno. Se consideraron dos condiciones, el agua no inoculada (NI) e inoculada (I) con el patógeno *P. irregulare*.

2.4 Análisis en el momento de la recolección

En el momento de la recolección se midió la producción total (rendimiento), la altura y área foliar de las hojas y el desarrollo de las raíces en 24 plantas por repetición y tratamiento. El área foliar se midió con un medidor de área foliar (LICOR-3100 C; LICOR Biosciences Inc., Lincoln, NE, EUA). La longitud y el diámetro total de la raíz se determinaron utilizando el programa Winrhizo LA 1600 (Regent Inc., Quebec, Canadá). El contenido de nitratos se cuantificó por cromatografía iónica [7], el contenido de fenoles totales se determinó por el método colorimétrico Folin-Ciocalteu [8]. La capacidad antioxidante se midió por el método descrito por Brand-Williams y col [9], con las modificaciones descritas por Pérez-Tortosa y col [10].

2.5 Análisis estadístico

Para el diseño experimental, se consideró un diseño de bloques al azar con 3 repeticiones por cada una de las combinaciones de inoculación y aplicación del té de compost. En cada una de

las repeticiones se dispusieron tres bandejas. Los datos tomados se sometieron a un análisis de variancia multifactorial ANOVA, utilizando el test LSD (95%) para la separación de las medias mediante el software Statgraphics Plus para Windows, versión 2.1.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dentro de los parámetros de crecimiento vegetativo hubo interacción significativa entre la inoculación y el modo de aplicación del té de compost en el rendimiento (Tabla 1). De los resultados obtenidos de la interacción los valores del rendimiento fueron significativamente más altos cuando se aplicó té de compost a la SN en condiciones de NI (Fig. 1A). En el crecimiento radical hubo interacción entre la inoculación y el modo de aplicación en la longitud total de la raíz (Tabla 1). La aplicación de té de compost por MA aumentó significativamente la longitud de la raíz en condiciones de NI, no existiendo diferencias significativas en condiciones de I. Hubo interacción significativa en todos los parámetros bioquímicos, entre la inoculación y el modo de aplicación del té de compost (Tabla 2). El contenido de nitratos fue significativamente menor en las plantas cultivadas cuando se aplicó el té de compost por MA tanto en condiciones de NI como I (Fig. 1B). Los valores obtenidos están muy por debajo de los contenidos máximos establecidos para las lechugas cultivadas en invernadero del 1 de octubre al 31 de marzo, los cuales no deben superar los 5.000 mg kg⁻¹ PF (EU). En cuanto a los niveles totales de fenoles y la capacidad antioxidante fueron significativamente mayores cuando se añadió té de compost por MA en condiciones de I (datos no mostrados).

4. CONCLUSIONES

El té de compost tiene efecto supresivo y añadido a la SN puede mejorar el rendimiento de lechugas *baby leaf* cultivadas en bandejas flotantes en condiciones de I. También, aplicando té de compost por MA disminuye el contenido de nitratos en presencia del patógeno. Estos resultados sugieren que el uso de té de compost podría ser alternativa en la producción de lechuga *baby leaf* en bandejas flotantes, mejorando la calidad en presencia del patógeno.

5. AGRADECIMIENTOS

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

6. REFERENCIAS

- [1] Ingham E.R. 2005. The compost tea brewing manual. Soil Food Web, Corvallis, OR, USA
- [2] Hernández T., Chocano C., Moreno J.L., García C. 2014. Towards a more sustainable fertilization: combined use of compost and inorganic fertilization for tomato cultivation. *Agric. Ecosyst. Environ.* 196: 178-184.
- [3] Zaccardelli M., Pane C., Scotti R., Palese A.M., Celano G. 2012. Use of compost teas as biopesticides and biostimulants in horticulture. *Italus Hort.* 19: 17-28.
- [4] Scheurell S., Mahaffee W.F. 2004. Compost tea as a container media drench for suppressing seeding damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Phytopa.* 94: 1156-1163.
- [5] Giménez A., Fernández J.A., Pascual J.A., Ros M., López-Serrano M., Egea-Gilabert C. 2019. An agroindustrial compost as alternative to peat for production of baby leaf red lettuce in a floating system. *Sci. Hortic.* 246: 907-915.
- [6] Egea-Gilabert C., Fernández J.A., Migliaro D., Martínez-Sánchez J.J., Vicente, M.J. 2009. Genetic variability in wild vs. cultivated *Eruca vesicaria* populations as assessed by morphological, agronomical and molecular analyses. *Sci. Hortic.* 121: 260-266.

[7] Lara L.J., Egea-Gilabert C., Niñirola D., Conesa E., Fernández J.A. 2011. Effect of aeration of the nutrient solution on the growth and quality of purslane (*Portulaca oleracea*). J. Hort. Sci. Biotech. 86: 603-610.

[8] Everette J.D., Bryant Q.M., Green A.M., Abbey Y.A., Wangila G.W., Walker, R.B. 2010. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. J. Agric. Food Chem. 58: 8139-8144.

[9] Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie. 28: 25-30.

[10] Pérez-Tortosa V., López-Orenes A., Martínez-Pérez A., Ferrer M.A., Calderón AA. 2012. Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. J. Agric. Food Chem. 130: 362-369.

Tabla 1. Influencia de la condición de inoculación (no inoculada -NI-, inoculada -I-) y de la aplicación de té de compost (solución nutritiva -SN-, microaspersores -MA-) en los parámetros de crecimiento aéreo y radical (rendimiento, área foliar, altura de la hoja, longitud total de la raíz, diámetro de la raíz, longitud de la raíz de 0 a 0,5 de diámetro de la raíz) en las hojas de lechuga roja *baby leaf* cultivada en un sistema flotante.

Parámetros	Inoculación (A)		Aplicación (B)		Interacción		
	NI	I	SN	MA	A	B	AxB
Rendimiento (kg m ⁻²)	2,30	2,18	2,16	2,32	n.s.	n.s.	*
Área foliar (cm ²)	47,19	45,72	47,6	45,3	n.s.	n.s.	n.s.
Altura hoja (cm)	11,05	12,14	12,03	11,95	n.s.	n.s.	n.s.
Longitud total raíz (cm)	172,64	171,65	163,65	180,64	n.s.	***	*
Diámetro raíz (mm)	0,34	0,35	0,34	0,36	n.s.	n.s.	n.s.
Longitud de raíz de 0 a 0,5 mm diámetro (cm)	144,9	148,57	142,47 a	157,03 b	n.s.	*	n.s.

Los valores dentro de la misma fila seguidos de una letra minúscula diferente son significativamente diferentes $P \leq 0,05$. El asterisco indica significados en * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; n.s.=no significativo.

Tabla 2. Influencia de la condición de inoculación (no inoculada -NI-, inoculada -I-) y de la aplicación de té de compost (solución nutritiva -SN-, microaspersores -MA-) sobre los parámetros bioquímicos (contenido de nitratos, fenoles totales, flavonoides totales, capacidad antioxidante) en las hojas de lechuga roja *baby leaf* cultivada en un sistema flotante.

Parámetros	Inoculación (A)		Aplicación (B)		Interacción		
	NI	I	SN	MA	A	B	AxB
Nitratos (mg kg ⁻¹ PF)	2094,27	1833,00	2397,77	1529,50	n.s.	***	***
Fenoles totales (mg AG kg ⁻¹ PF)	1276,76	1719,64	1378,51	1617,89	***	***	***
Capacidad antioxidante (mg DDPH kg ⁻¹ PF)	129,42	147,83	132,72	144,54	**	*	***

Los valores dentro de la misma fila seguidos de una letra minúscula diferente son significativamente diferentes $P \leq 0,05$. El asterisco indica significados en * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; n.s.=no significativo.

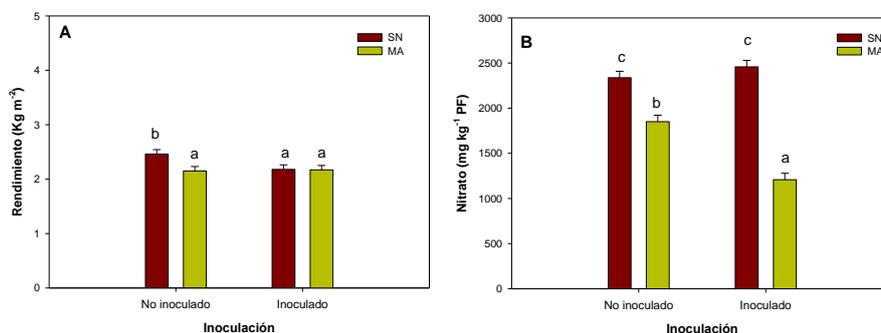


Fig. 1. Efecto de la condición de inoculación (no inoculado, inoculado) y el modo de aplicación del té de compost (solución nutritiva -SN-, microaspersión -MA-) en el rendimiento (A) y en el contenido de nitratos (B) de lechuga roja *baby leaf*. Los valores son los valores medios y las líneas verticales son los intervalos de diferencia menos significativa (LSD) en $P \leq 0,05$. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Influence of methyl jasmonate during white mustard sprouting

Influencia del metil jasmonato durante la germinación de semillas de mostaza

N. Castillejo^{1,2*}, G.B. Martínez-Hernández^{1,2}, F.D. Miranda-Molina^{1,3}, T.V. Klug², P. Gómez², F. Artés^{1,2}, F. Artés-Hernández^{1,2}

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

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

³Universidad Autónoma Chapingo, Mexico- Texcoco km 38,5, Chapingo, 56230, Texcoco de Mora. Mexico

*noelia.castillejo@upct.es

Abstract

In recent years there has been a notable interest in sprouts for being very nutritious and healthy products. The sprouts are richer in bioactive compounds than the developed plant. The propose of this work was to study the effect of methyl jasmonate (MJ), as a chemical elicitor, during the germination of mustard seeds under the normal light and dark conditions. The CTRL sprouts had the longest hypocotyl length under both light (6.31) and dark (9.51 cm) conditions, while the different concentrations of MJ resulted in a decrease of the hypocotyl length, being greater under the light condition. The percentage of germination in the CTRL was 97.3% in both light and dark conditions while with MJ they tended to decrease to values of 93.5-95% in dark condition. However, the germination percentage remained constant in light conditions. According to these preliminary data, MJ did not significantly influence in the productivity, being therefore very interesting its study as abiotic stress to enhance bioactive compounds in future trials.

Keywords: *Sinapis alba*; photoperiod; elicitor; cruciferous.

Resumen

En los últimos años se ha experimentado un notable interés en los germinados de semillas por ser productos muy nutritivos y saludables, siendo incluso más ricos en compuestos beneficiosos para la salud que la planta desarrollada como es el caso de las crucíferas. El presente trabajo estudia el efecto del metil jasmonato (MJ), como elicitor químico, durante la germinación de brotes de mostaza en condiciones de ciclo de luz normal y oscuridad. Los germinados CTRL presentaron la mayor longitud de hipocótilo tanto bajo condiciones de luz (6,31 cm) como de oscuridad (9,51 cm), mientras que las diferentes concentraciones de MJ supusieron una disminución, siendo mayores bajo la condición de luz. El porcentaje de germinación en el CTRL fue del 97,3% tanto en condiciones de luz y oscuridad mientras que con MJ disminuyeron hasta valores de 93,5-95% en condición de oscuridad. Mientras, que en condiciones de luz se mantuvo constante. Según estos datos preliminares, el MJ no influyó significativamente en la productividad, siendo por tanto muy interesante su estudio como estrés abiótico para potenciar los compuestos bioactivos en futuros ensayos.

Palabras clave: *Sinapis alba*; fotoperiodo; elicitor; crucíferas.

1. INTRODUCCIÓN

La producción y el consumo de germinados ha suscitado un gran interés en los últimos años debido a su alto valor nutritivo incluyendo aminoácidos, fibra, vitaminas y, fenoles, entre otros. Los germinados son un ejemplo de “alimentos funcionales” ya que están asociados a la reducción de ciertas enfermedades [1]. Los germinados tienen un ciclo de crecimiento corto (4 a 10 días) y normalmente crecen en oscuridad sin fertilizantes ni agroquímicos. Son comestibles en su totalidad incluyendo las raíces [2].

El consumo de crucíferas reduce el riesgo de cáncer, enfermedades degenerativas y modulación de los trastornos metabólicos relacionados con la obesidad [3]. Se ha demostrado que los germinados de crucíferas tienen un mayor contenido de compuestos bioactivos en comparación con la planta adulta [4]. Estos beneficios son aprovechados mayormente cuando las crucíferas se consumen crudas, como los germinados, evitando la degradación de la enzima mirosinasa que es necesaria para hidrolizar los glucosinolatos a isotiocianatos [5].

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Las semillas de mostaza blanca (*Sinapis alba*), compradas en Batlle S.A., (Barcelona, Spain) se germinaron en placas Petri de 13,5 cm de diámetro con fibra de coco. En cada placa se dispusieron aproximadamente 200 semillas de mostaza, constituyendo cada placa Petri una repetición. Las condiciones de germinación fueron 9 días a 25°C bajo dos fotoperiodos diferentes uno de luz (24 horas) y otro de oscuridad (24 horas). Para la germinación, se añadió agua (CTRL), o agua incluyendo el elicitador químico, metil jasmonato (MJ), en forma de spray cada 12 horas. El MJ se aplicó en diferentes concentraciones (10, 25, 50 y 100 µM).

2.1 Longitud del hipocótilo

La longitud del hipocótilo fue medida cada día de salida, 0, 3, 6 y 9 días. Para ello, se tomaron 20 germinados por placa y se evaluaron en cada salida.

2.2 Porcentaje de germinación

El número de semillas viables se contabilizaron tras la germinación, teniendo en cuenta el número inicial de semillas y el número de ellas que finalmente germinaron adecuadamente. Para ello se aplicó la siguiente ecuación:

$$\%germinación = \frac{\text{nº de semillas germinadas}}{200} \times 100$$

2.3 Estadística

El experimento fue un diseño de dos factores (tratamiento × condición de germinación) sujeto a análisis de varianza (ANOVA) usando el software Statgraphics Plus (vs. 5.1, Statpoint Technologies Inc., Warrenton, USA). La significación estadística se evaluó en el nivel $p=0,05$, y se utilizó la prueba de rango múltiple de Tukey para separar las medias.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El porcentaje de germinación de las semillas de mostaza CTRL fue de 97,3% tanto en condiciones de luz como de oscuridad (Fig. 1). Sin embargo, en los germinados tratados con MJ se observó una tendencia a disminuir en condiciones de oscuridad con respecto a las condiciones de luz, excepto en MJ10 (MJ en concentración de 10 µM), que es la concentración más baja aplicada.

Los germinados CTRL fueron los que mayor longitud presentaron tanto en condiciones de luz (6,31 cm) como de oscuridad (9,51 cm) con respecto al MJ (Tabla 1). Según Yan et al. [6] el MJ es considerado un inhibidor de la apertura de los estomas, de la actividad fotosintética y del

crecimiento de la planta. Además, según Keramat et al. [7] concentraciones bajas de MJ aumentan la respuesta contra factores de estrés abióticos.

4. CONCLUSIONES

El estrés abiótico inducido en la germinación de mostaza mediante el elicitor químico MJ en condiciones de oscuridad no mostró diferencias de crecimiento en longitud relevantes frente al CTRL. La mayor dosis de MJ aplicada en oscuridad indujo mayor crecimiento en longitud de los germinados. El tratamiento CTRL en oscuridad junto con el tratamiento MJ10 obtuvieron los mayores porcentajes de germinación. Sin embargo, en luz sólo el tratamiento MJ10 obtuvo un porcentaje de germinación significativamente menor al resto.

5. AGRADECIMIENTOS

Se agradece la financiación a la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia a través del Programa Regional de Fomento de la Investigación Científica y Técnica de la Fundación Séneca-Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia (Proyecto Ref 20849/PI/18). Se agradece igualmente al Ministerio de Economía y Competitividad la concesión de un contrato predoctoral a Noelia Castillejo (FPU/04763).

6. REFERENCIAS

- [1] Paško, P., Bartoń, H., Zagrodzki, P., Gorinstein, S., Fołta, M., Zachwieja, Z. 2009. Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. *Food Chemistry*, 115(3), 994-998.
- [2] Di Gioia F., Renna M., Santamaria P. 2017. Sprouts, Microgreens and “Baby Leaf” Vegetables. In: *Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables*, 2nd ed, F. Yildiz, R.C. Wiley, eds. (Springer US). Pp.403-432.
- [3] Baenas, N., Suárez-Martínez, C., García-Viguera, C., & Moreno, D. A. 2017. Bioavailability and new biomarkers of cruciferous sprouts consumption. *Food research international*, 100, 497-503.
- [4] Pérez-Balibrea, S., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. 2011. Genotypic effects on the phytochemical quality of seeds and sprouts from commercial broccoli cultivars. *Food Chemistry*, 125(2), 348-354.
- [5] Angelino, D., Jeffery, E. 2014. Glucosinolate hydrolysis and bioavailability of resulting isothiocyanates: Focus on glucoraphanin. *Journal of Functional Foods*, 7, 67-76.
- [6] Yan, Z., Zhang, W., Chen, J., and Li, X. (2015). Methyl jasmonate alleviates cadmium toxicity in *Solanum nigrum* by regulating metal uptake and antioxidative capacity. *Biol. Plant* 59, 373-381.
- [7] Keramat, B., Kalantari, K. M., and Arvin, M. J. (2009). Effects of methyl jasmonate in regulating cadmium induced oxidative stress in soybean plant (*Glycine max* L.). *Afr. J. Microbiol. Res.* 31, 240-244.

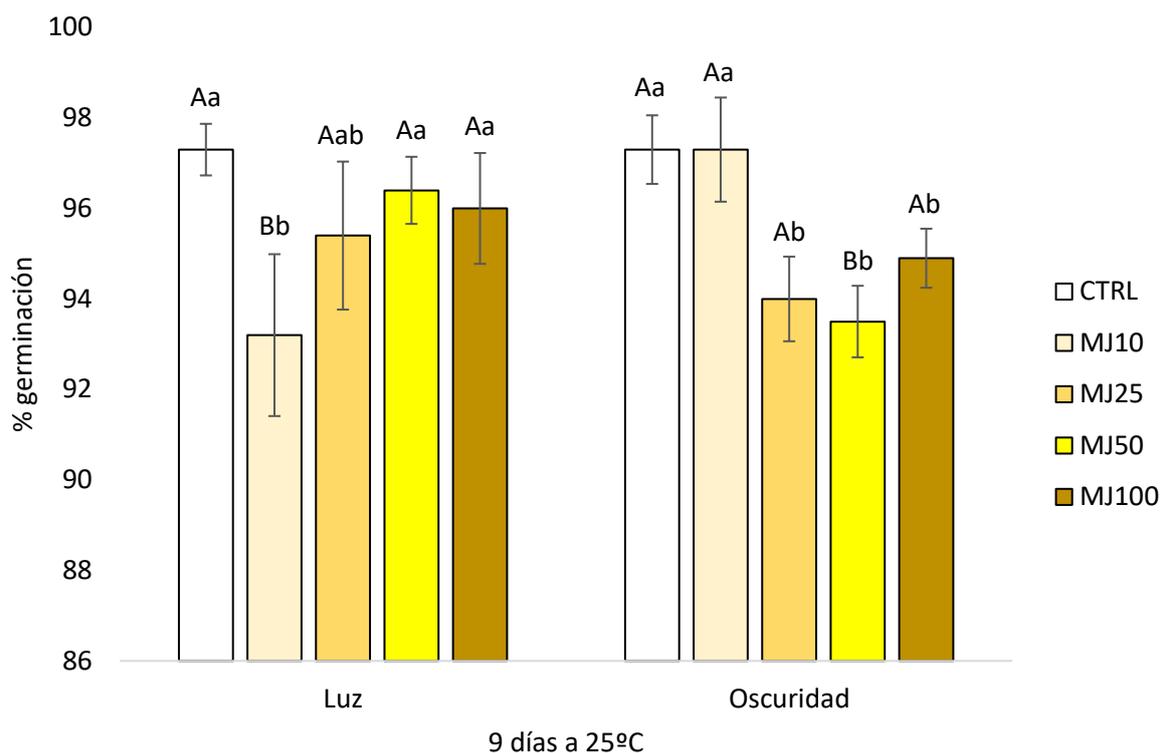


Figura 1. Porcentaje de germinación de la mostaza blanca bajo condiciones de crecimiento de luz y oscuridad durante 9 días a 25°C. Letras mayúsculas diferentes denotan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre condiciones de crecimiento para un mismo tratamiento. Letras minúsculas diferentes denotan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos para la misma condición de crecimiento.

Tabla 1. Longitud (cm) del hipocótilo de los germinados de mostaza tras 9 días a 25°C. Letras mayúsculas diferentes denotan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre condiciones de crecimiento para un mismo tratamiento. Letras minúsculas diferentes denotan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos para la misma condición de crecimiento.

Tratamientos	Luz	Oscuridad
CTRL	$6,31 \pm 0,07^B_a$	$9,51 \pm 0,52^A_a$
MJ10	$4,06 \pm 0,05^B_c$	$8,30 \pm 0,26^A_c$
MJ25	$4,22 \pm 0,04^B_b$	$6,41 \pm 0,57^A_e$
MJ50	$3,31 \pm 0,05^B_e$	$6,87 \pm 0,31^A_d$
MJ100	$3,47 \pm 0,21^B_d$	$9,11 \pm 0,19^A_b$

Evaluation of different crop water status indicators in early flat peach Carioca variety

Evaluación de diferentes indicadores de estado hídrico del cultivo en paraguayo temprano variedad Carioca

A. Temnani Rajjaf*, J.M. De La Rosa, A. Pérez-Pastor

Departamento de Ingeniería Agronómica. ETSIA-UPCT, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena. Spain

*abdelmalek.temnani@edu.upct.es

Abstract

The regulated deficit irrigation (RDC) strategies achieve important water savings without generating losses in crop production and quality and thus increasing the efficiency in the use of water. However, this technique requires knowing the crop water status all the time to minimize the risks of incurring excessive water stress. Therefore, a regulated deficit irrigation experiment was carried out in flat peach crop (*P. persica* var. *platycarpa* 'Carioca') to evaluate the feasibility of using different plant water stress indicators in this crop.

Keywords: RDI; irrigation; indicator; *Prunus*; peach.

Resumen

Las estrategias de riego deficitario controlado (RDC) consiguen importantes ahorros de agua sin generar mermas en la producción y calidad de las cosechas y aumentando de esta forma la eficiencia en el uso del agua. Sin embargo, esta técnica requiere conocer en todo momento el estado hídrico del cultivo a fin de minimizar los riesgos de incurrir en un estrés hídrico excesivo y maximizar la productividad del agua de riego. Por esto, se realizó un ensayo de riego deficitario controlado en paraguayo (*P. persica* var. *platycarpa* "Carioca") a fin de evaluar la viabilidad del uso de diferentes indicadores de estrés hídrico de la planta en este cultivo.

Palabras clave: RDC; riego; indicador; *Prunus*; paraguayo.

1. INTRODUCCIÓN

La escasez de los recursos hídricos que sufren los agricultores de la Región de Murcia, junto con la alta demanda de productos de calidad por parte de los mercados exteriores, así como la mayor sensibilización de la sociedad en temas medioambientales, obliga a los agricultores a desarrollar nuevas herramientas que permitan optimizar el agua de riego sin afectar negativamente a los parámetros de calidad de la fruta y propiciando una agricultura sostenible y respetuosa con el medio ambiente.

En este sentido, las estrategias de riego deficitario controlado (RDC) consiguen importantes ahorros de agua sin generar mermas en la producción y calidad de las cosechas y aumentando de esta forma la eficiencia en el uso del agua [1]. Sin embargo, esta técnica requiere conocer en todo momento el estado hídrico del cultivo a fin de minimizar los riesgos de incurrir en un estrés hídrico excesivo. Para ello se debe de evaluar la sensibilidad que muestran los diferentes

indicadores del estado hídrico del cultivo al estrés hídrico para este cultivo, siendo este el principal objetivo del estudio

Los estudios realizados al respecto evalúan la sensibilidad de indicadores que son de alto coste económico de implantación, que requieren importantes conocimientos técnicos para su manejo y que por tanto tienen un limitado interés práctico. En este trabajo, se ha propuesto además el uso de indicadores de bajo coste y fácil aplicabilidad como es el caso de la temperatura foliar que se mide con un termómetro de infrarrojos de bajo coste (≈ 20 €) y de muy fácil manejo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en una finca experimental en Molina de Segura. Se establecieron dos tratamientos de riego con tres repeticiones cada uno de ellos y 6 árboles cada repetición: i) tratamiento control (CTL), sin condiciones limitantes de agua en el suelo (110% ETC), ii) tratamiento deficitario (RDC), en el que se redujo la cantidad de agua aplicada en un 57% del CTL. Una vez establecidos los tratamientos, se tomaron las siguientes medidas a fin de caracterizar el estado hídrico del cultivo:

2.1 Potencial de tallo

Se midió con cámara de presión de Scholander al medio día solar (en torno a las 13:00 h) aproximadamente cada 10 días y en hojas cubiertas con film aluminizado dos horas antes de la medida [2, 3].

2.2 Medidas de FDT (fluctuaciones de diámetro de tronco)

Se midieron las fluctuaciones del diámetro de tronco a partir de 6 sensores LVDT por tratamiento, colocados sobre un portasensor de aleación de INVAR. A partir de estas fluctuaciones se determinaron diferentes índices según Goldhamer y Fereres 2001 [4]: máxima contracción diaria de tronco (MCD) como la diferencia entre el máximo diámetro de tronco (MXDT) que tiene lugar a primera hora de la mañana y mínimo diámetro de tronco (MNDT) que tiene lugar a final de la tarde [5, 6]. Y la tasa de crecimiento de tronco (TCD) determinada a partir de la diferencia del máximo diámetro de tronco MXDT de dos días consecutivos [7, 8, 9].

2.3 Potencial matricial de suelo

El estado hídrico del suelo se evaluó a partir de la tensión matricial de esta medida con sensores MPS6 (actualmente denominados Teros21).

2.4 Temperatura foliar

Se realizaron medidas puntuales de temperatura foliar con un termómetro de infrarrojos (modelo Helect H1020). Las medidas se realizaron en 3 horas diferentes del día (10, 12, 14 hora solar) y en diferentes lugares de la planta: i) hojas al sol: a un cm de la hoja soleada, ii) hojas a la sombra: a un cm de la hoja sombreada, iii) dosel al sol: a 1,5 m de la parte soleada del dosel vegetal, iv) dosel a la sombra: a 1,5 m de la parte sombreada del dosel vegetal. A partir de estas medidas de temperatura (tanto de hoja como de zona) se determinaron varios de los indicadores del estado hídrico de la planta [10, 11]:

(i) Temperatura foliar menos la temperatura del aire ($T_f - T_a$)

(ii) CWSI, determinado a partir de la siguiente ecuación

$$CWSI = \frac{(T_c - T_a) - (T_c - T_a)_{LI}}{(T_c - T_a)_{LS} - (T_c - T_a)_{LI}}$$

donde T_c es la temperatura del cultivo, T_a es la temperatura del aire, LI hace referencia a las temperaturas de los árboles sin estrés (control), y LS a las temperaturas de los árboles estresados.

Los valores de CWSI oscilan entre 0 y 1, donde valores cercanos a cero indican ausencia de estrés y valores cercanos a uno, existencia de este [12].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

T_{RDC} presentó valores de potencial matricial (Ψ_m) sensiblemente inferiores a los de T_{CTL} . Al mismo tiempo, el potencial hídrico de tallo (Ψ_T) en T_{RDC} presentó valores significativamente inferiores a los de T_{CTL} durante casi todo el periodo de estudio llegando a valores mínimos de -1,86 MPa (estrés hídrico severo). La máxima contracción diaria (MCD) fue significativamente superior en T_{RDC} durante el periodo de déficit hídrico. Sin embargo, la tasa de crecimiento diaria de tronco (TCD) presentó menores diferencias.

Las hojas de T_{CTL} habitualmente presentaron temperaturas foliares (Tf) sensiblemente inferiores a las del aire y los valores de CWSI presentaron valores cercanos a 0 (ausencia de estrés) al inicio del periodo de déficit hídrico que se incrementó conforme avanzó el ciclo del cultivo.

La relación entre Ψ_m y Ψ_T fue lineal, indicando que el estado hídrico del suelo explicaba en un alto porcentaje el estado hídrico del cultivo. Se encontró buena correlación entre Ψ_T y CWSI siendo mayor el ajuste al mediodía, momento en el que se midió Ψ_T .

MCD fue el indicador que presentó mayor intensidad de señal ($IS = 2,66$), siendo esta la relación entre los valores de tratamiento de riego deficitario y los valores de control, seguido de TCD (1,58), Ψ_T (1,30) y Tf (entre 1,04 y 1,10). En cuanto a la variabilidad de las medidas TCD muestra el mayor coeficiente de variación (CV, 0,50), seguida por MCD (0,18), Ψ_T (0,12) y Tf (entre 0,02 y 0,05). Por lo tanto, MCD muestra los valores más altos de sensibilidad ($S^*=9,0$), siendo la sensibilidad la relación entre la intensidad de señal y el coeficiente de varianza, seguido de la Tf (S^* entre 1,1 y 4,1), Ψ_T ($S^*=2,4$) y TCD ($S^*=1,2$).

4. CONCLUSIONES

1. MCD fue el indicador que mayor sensibilidad presentó y además mostró una rápida respuesta al déficit hídrico. En cambio, el alto coste económico junto con la complejidad podría reducir su uso en campo.

2. Ψ_T fue muy sensible al déficit hídrico y tiene la ventaja de ser un indicador que ha dado buen resultado en infinidad de cultivos. Sin embargo, su medida manual y tediosa es un inconveniente a tener en cuenta.

3. La temperatura foliar y sus indicadores derivados presentaron una elevada sensibilidad al déficit hídrico y su facilidad en el manejo y bajo coste lo postulan como una herramienta útil para determinar el estado hídrico del cultivo.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Fundación Séneca (Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia (19895/GERM/15, Financial Aid to groups and units of Scientific excellence in the Region of Murcia)

6. REFERENCIAS

[1] Zhang, H. y Oweis, T. 1999. Water-yield relations and optimal irrigation scheduling of wheat in the Mediterranean region. *Agricultural Water Management*, 38: 195-211.

- [2] Shackel, K.A., Ahmadi, H., Biasi, W., Buchner, R., Goldhamer, D.A., Gurusinghe, S.H., Hasey, J., Kester, D., Krueger, B., Lampinen, B., McGourty, G., Micke, W., Mitcham, E., Olson, B., Pelletrau, K., Philips, H., Ramos, D., Schwankl, L.J., Sibbet, S., Snyder, R., Southwick, S., Stevenson, M., Thorpe, M., Weinbaum, S. y Yeager, J. 1997. Plant water status as an index of irrigation need in deciduous fruit trees. *HortTechnology* 7: 23-29.
- [3] Scholander, P.F., Hammel, H.T., Bradstreet, E.D. y Hemingsen, E.A. 1965. Sap pressure in vascular plants. *Science* 148: 339-346.
- [4] Goldhamer, D.A. y Fereres, E. 2001. Irrigation scheduling protocols using continuously recorded trunk diameter measurements. *Irrigation Science*, 20 (3): 115-125.
- [5] Remorini, D. y Massai, R. 2003. Comparison of water status indicators for young peach trees. *Irrigation Science*, 22: 39-46.
- [6] Conejero, W., Alarcón, J.J., García-Orellana, Y., Abrisqueta, J.M. y Torrecillas, A. 2007. Daily sap flow and maximum daily trunk shrinkage measurements for diagnosing water stress in early maturing peach trees during the post-harvest period. *Tree Physiology*, 27 (1): 81-88.
- [7] Goldhamer, D.A. y Fereres, E. 2004. Irrigation scheduling of almond trees with trunk diameter sensors. *Irrigation Science* 23: 11-19.
- [8] Garcia-Orellana, Y., Ruiz-Sánchez, M.C., Alarcón, J., Conejero, W., Ortuño, M.F., Nicolás, E. y Torrecillas, A. 2007. Preliminary assessment of the feasibility of using maximum daily trunk shrinkage for irrigation scheduling in lemon trees. *Agricultural Water Management* 89: 167-171
- [9] Intrigliolo, D.S. y Castel, J.R. 2006. Performance of various water stress indicators for prediction of fruit size response to deficit irrigation in plum. *Agricultural Water Management*, 83 (1-2): 173-180.
- [10] Jackson, R.D., Reginato, R.J., Pinter, P.J. y IDSO, S.B. 1979. Wheat canopy temperature: A practical tool for evaluating water requirements. *Water Resour. Res.* 13: 651-656.
- [11] Turner, N.C. 1990. Plant water relations and irrigation management. *Agric. Water Manag.* 17: 59-73.
- [12] Idso, S.B., Jackson, R.D., Pinter, P.J., Reginato, R.J. y Hatfield, J.L. 1981. Normalizing the stress-degree-day parameter for environmental variability. *Agricultural Meteorology* 24: 45-55.

Low-Cost infrared thermography for water stress detection in almond trees

Termografía infrarroja de bajo coste para la detección de estrés hídrico en almendros

P.J. Blaya-Ros^{1*}, R. Torres-Sánchez², V. Blanco-Montoya¹, R. Domingo¹

¹Dpto. de Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, Pase Alfonso XIII, 48. 30203, Cartagena. Spain

²Dpto. de Automática, Ingeniería Eléctrica y Tecnología Electrónica, Universidad Politécnica de Cartagena. Spain

*pedro.blaya@upct.es

Abstract

In the Mediterranean basin, where water is the main limiting production factor, accurate and careful application of irrigation volumes is key. In this sense, the use of deficit irrigation strategies linked to the use of technologies can contribute to improving the efficiency and sustainability of irrigated agriculture. The aim of this study was to assess the adequacy of infrared thermography for water status detection in 'Marta' almond trees. For that purpose, an irrigation experiment was conducted in 2018 that consisted of three treatments: ii) a control, CTL, irrigated at 115% of the crop evapotranspiration (ET_c) and iii) two regulated deficit irrigation treatments, RDC45 and RDC30, both irrigated at 100% ET_c, except during kernel-filling period, stage IV (June - mid-August), when they were irrigated at 45 and 30% ET_c, respectively. Thermal-water stress indexes derived from canopy temperature, T_c, were sensitive indicators almond trees water status under different water-stress conditions.

Keywords: canopy temperature; stem water potential; water relations.

Resumen

En la cuenca mediterránea, donde el principal factor limitante de la producción es el agua, la aplicación precisa de los volúmenes de riego es clave. En este sentido, el uso de las nuevas tecnologías puede contribuir a la mejora de la eficiencia de uso del agua y sostenibilidad de la agricultura. El objeto de este trabajo fue evaluar la idoneidad de la termografía infrarroja para la determinación del estado hídrico de almendros 'Marta'. Para ello, se llevó a cabo un ensayo de riego en 2018 que constó de tres tratamientos: i) un control, CTL, regado al 115% de la evapotranspiración del cultivo (ET_c) y ii) dos tratamientos de riego deficitario controlado, RDC45 y RDC30, regados al 100% ET_c, a excepción de la fase de llenado de grano, fase IV (junio - mediados de agosto), cuando se aplicó el 45 y 30% ET_c, respectivamente. Los índices térmicos derivados de la temperatura de la copa, T_c, fueron indicadores sensibles del estado hídrico del almendro originado bajo las diferentes condiciones hídricas impuestas.

Palabras clave: temperatura de la copa; potencial hídrico de tallo; relaciones hídricas.

1. INTRODUCCIÓN

En la cuenca mediterránea, donde ocurren fuertes déficits hídricos estacionales, es prioritario optimizar el uso del agua en la agricultura, por tratarse del principal destinatario de los recursos hídricos disponibles [1]. Esta realidad ha dado lugar a diversas actuaciones tendentes a racionalizar el uso del agua; entre ellas, la programación científico-técnica del riego. La termografía infrarroja emergió como una herramienta para conocer el estado hídrico de un cultivo de forma rápida y no destructiva y para su aplicación a la programación de los riegos [2]. La temperatura de la copa (T_c) es un indicador del nivel de transpiración o del grado de apertura del estoma y por tanto, es una medida de la respuesta de la planta a ambientes adversos [3]. Independientemente de ello, las relaciones entre T_c y los parámetros fisiológicos del cultivo no siempre tienen una estrecha relación en condiciones de campo [4]. Para minimizar la influencia de determinados factores ambientales se obtuvieron diversos índices de estrés térmico derivados de T_c [3].

El objetivo de este trabajo fue evaluar la utilidad de las imágenes térmicas obtenidas con una cámara térmica de bajo coste conectada a un Smartphone en la determinación del estado hídrico de almendros adultos sometidos a riego deficitario controlado.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se llevó a cabo durante 2018 en almendros (*Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb) ‘Marta’ injertados sobre ‘Mayor’ en una parcela experimental de 1 ha de superficie perteneciente a la Estación Experimental Agroalimentaria ‘Tomás Ferro’ (ETSIA-UPCT), ubicada en La Palma, Cartagena (37º 41’ N, 0º 57’ E). Los árboles, de 17 años de edad y diámetro de tronco de 24,18 cm, están dispuestos a marco de 7 m x 6 m. El sistema de riego por goteo constaba de dos laterales por hilera de árboles y emisores autocompensantes de 4 L h⁻¹ a un metro de separación (12 emisores árbol⁻¹). El agua de riego, proveniente del transvase Tajo-Segura, presentó una conductividad eléctrica (CE) de 1,1 dS m⁻¹. Todos los tratamientos recibieron idénticos cuidados agrícolas. Se ensayaron 3 tratamientos de riego según un diseño de bloques al azar con 3 repeticiones y 12 árboles por repetición. Los tratamientos de riego fueron: i) control, CTL, regado al 115% de la evapotranspiración del cultivo (ET_c) y ii) dos riegos deficitarios controlados, RDC45 y RDC30, regados al 100% de ET_c , a excepción de la fase de llenado de grano, fase IV (junio – mediados de agosto) cuando se aplicó el 45% y 30% de ET_c , respectivamente. Las dosis de riego se calcularon semanalmente a partir de la estimación de la evapotranspiración del cultivo: $ET_c = ET_0 \times K_c \times K_L$, donde K_c es el coeficiente de cultivo y K_L el de localización.

El potencial hídrico de tallo a mediodía (Ψ_{stem}) se midió periódicamente con una cámara de presión tipo Scholander (mod. SF-PRES-70, SolFranc Tecnologías, S.L., España) en hojas envueltas con una lámina de polietileno negro y encima de esta otra de papel de aluminio al menos 2 horas antes de las medidas (Hsiao, 1990). La temperatura de la copa (T_c) se midió con una cámara térmica (Flir One, Flir Systems, Wilsonville, OR, USA) conectada a un teléfono inteligente, smartphone, y coincidiendo con las medidas de Ψ_{stem} . Las imágenes se tomaron en la parte soleada del árbol y a una distancia de 1,5 m de la copa, en 2 árboles por repetición (n=6). La emisividad fue configurada en “matt” ($\epsilon=0,95$) [4]. Una vez obtenida T_c , se calculó la diferencia entre la temperatura de la copa y la del aire circundante (ΔT) y el índice de estrés hídrico del cultivo (CWSI, crop water stress index) [5]. Los datos de temperatura del aire circundante (T_{air}), humedad relativa (HR) y el déficit de presión de vapor (DPV) fueron obtenidos mediante tres sensores VP-4 (METER Group Inc., Pullman, USA) y almacenados en nodos inalámbricos con conexión remota a servidores en la nube (Widhoc Smart Solutions, Fte Alamo España). Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa IBM SPSS Statistics (SPSS Inc., 24.0 Statistical package; Chicago, IL, USA).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El potencial de tallo a mediodía (Ψ_{stem}) reflejó el manejo de riego seguido en los diferentes tratamientos de riego (Fig. 1a). El tratamiento CTL presentó valores medios de Ψ_{stem} de -0,71 MPa durante el periodo experimental, valores característicos de almendros bajo condiciones no limitantes de agua [6]. Los árboles RDC45 y RDC30 mantuvieron valores Ψ_{stem} semejantes a CTL durante aquellos periodos donde todos los tratamientos se regaban para satisfacer las necesidades hídricas del cultivo, Fase II+III y V. En cambio, durante la fase IV, periodo de déficit hídrico y alta demanda climática, se produjo una caída de Ψ_{stem} en ambos tratamientos deficitarios, alcanzando valores mínimos de Ψ_{stem} de -1,83 y -2,08 MPa para los árboles RDC45 y RDC30, respectivamente. Los valores obtenidos en los árboles de los tratamientos deficitarios fueron claramente inferiores a los de los árboles CTL, como consecuencia del agotamiento progresivo del agua del suelo (datos no mostrados). El aumento de la energía absorbida por el cultivo como consecuencia de la regulación estomática ante un déficit hídrico reduce la transpiración y con ello la disipación de calor a través de la evaporación del agua [3], y como consecuencia aumenta tanto T_c como ΔT (Fig. 1b y 1c). Los árboles CTL presentaron valores T_c inferiores a T_{air} (ΔT media = -0,76°C) durante todo el periodo experimental. La sensibilidad de ΔT para detectar el estrés hídrico se puso de manifiesto en la Fase IV, especialmente al final del periodo, donde los tratamientos bajo restricción hídrica alcanzaron valores de ΔT de 3 y 4°C para los tratamientos RDC45 y RDC30, respectivamente. Los datos obtenidos son similares a los obtenidos por García-Tejero *et al.* en almendro [4], quienes observaron un aumento entre 3 y 5°C en los tratamientos con restricción hídrica.

La Fig. 1d muestra la evolución estacional de CWSI, indicador calculado a partir de las líneas base de no-estrés (LNE; estomas completamente abiertos) y de máximo estrés (LME; estomas completamente cerrados) [3]. CWSI sugiere que los árboles CTL mantuvieron una alta apertura estomática durante el ensayo, a excepción del día del año (DDA) 234 día de alta demanda climática. Los tratamientos deficitarios mostraron una tendencia similar a la mostrada por ΔT , observándose un cierre estomático alto durante el periodo de restricción hídrica, fase IV, alcanzando un CWSI del 60% el DDA 234 en los árboles RDC30. Del mismo modo, RDC45 mostró un CWSI medio durante la reducción hídrica del 35%. La relación entre los indicadores térmicos derivados de T_c y Ψ_{stem} mostraron un alto nivel de significancia (Tabla 1), 0,85 y 0,80 para ΔT y CWSI, respectivamente. Estos resultados apoyan la idoneidad de los índices térmicos [4] para detectar situaciones de déficit hídrico en almendros 'Marta'. E igualmente, sugieren su interés práctico en el manejo del riego del almendro.

4. CONCLUSIONES

El uso de la termografía infrarroja a partir de cámaras térmicas de bajo coste conectadas a un teléfono móvil, puede ser una herramienta útil para la determinación del estado hídrico del almendro. La temperatura de la copa del árbol y más concretamente los índices derivados de ella, diferencias de temperaturas copa-aire (ΔT) y el índice de estrés hídrico del cultivo (CWSI) pueden ser indicadores útiles para el seguimiento del estado hídrico del almendro y en el manejo del riego.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad del Gobierno de España, MINECO (Ref. AGL2016-77282-C3-3-R) y la Fundación Séneca de la Región de Murcia (Grupo de excelencia 2016-2019, Ref. 19895/GERM/15).

6. REFERENCIAS

- [1] Fereres, E., Soriano, M.A., 2007. Deficit irrigation for reducing agricultural water use. *J. Exp. Bot.* 58, 147–159.
- [2] García-Tejero, I.F., Gutiérrez-Gordillo, S., Ortega-Arévalo, C., Iglesias-Contreras, M., Moreno, J.M., Souza-Ferreira, L., Durán-Zuazo, V.H., 2018. Thermal imaging to monitor the crop-water status in almonds by using the non-water stress baselines. *Sci. Hortic.* 238, 91–97.
- [3] Jones, H.G., 2018. Thermal Imaging and Infrared Sensing in Plant Ecophysiology. In A. M. Sánchez-Moreiras, A. M., Reigosa, M. J. (Eds.), *Advances in Plant Ecophysiology Techniques*. pp. 135-151.
- [4] García-Tejero, I.F., Rubio, A.E., Viñuela, I., Hernández, A., Gutiérrez-Gordillo, S., Rodríguez-Pleguezuelo, C.R., Durán-Zuazo, V.H., 2018b. Thermal imaging at plant level to assess the crop-water status in almond trees (cv. Guara) under deficit irrigation strategies. *Agric. Water Manag.* 208, 176–186.
- [5] Jackson, R., Idso, S., Reginato, R., Pinter, P., 1981. Canopy temperature as a Crop Water Stress Indicator. *Water Resour. Res.* 17, 1133–1138.
- [6] Puerto, P., Domingo, R., Torres, R., Pérez-Pastor, A., García-Riquelme, M., 2013. Remote management of deficit irrigation in almond trees based on maximum daily trunk shrinkage. *Water relations and yield. Agric. Water Manag.* 126, 33–45.

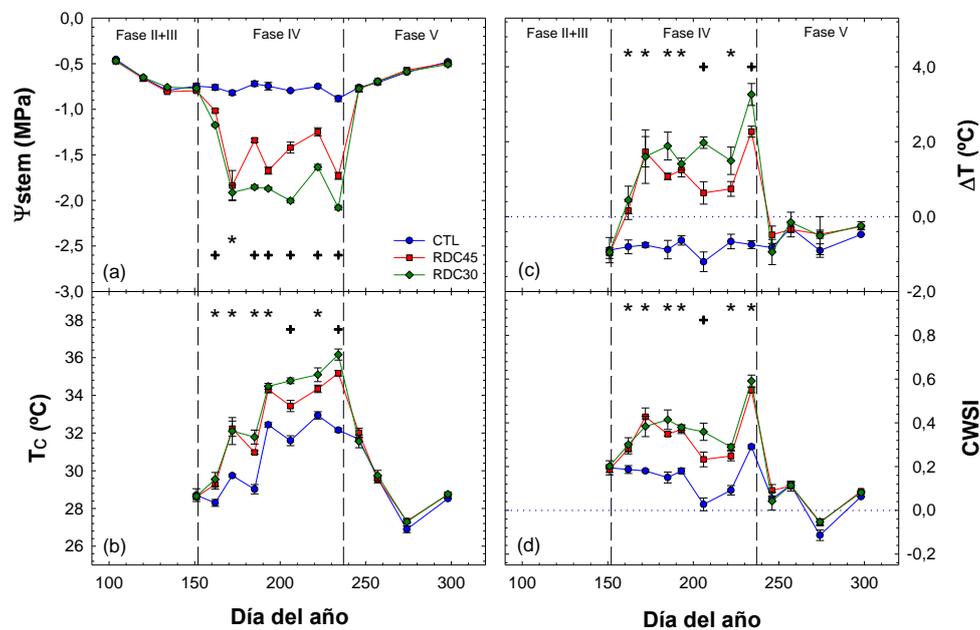


Figura 1. Evolución (a) del potencial hídrico de tallo (Ψ_{stem}), (b) de la temperatura de la copa (T_c), (c) de la diferencia de temperaturas copa y aire circundante (ΔT) y (d) del índice de estrés hídrico del cultivo (CWSI) durante el periodo experimental. Cada punto es la media de 6 medidas por tratamiento. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre el tratamiento control (CTL) y los de riego deficitario controlado (RDC45 y RDC30) y los signos (+) indican diferencias entre todos los tratamientos según ANOVA ($p < 0,05$).

Tabla 1. Parámetros de las ecuaciones de primer orden ($y = ax + b$) obtenidas entre el potencial hídrico de tallo a mediodía (Ψ_{stem}) y las variables térmicas durante las fases IV y V del ciclo del almendro en 2018.

Relación	R ²	n	a	b
Ψ_{stem} vs T_c	0,61***	36	-3,91	26,89
Ψ_{stem} vs ΔT	0,85***	36	0,173	-2,092
Ψ_{stem} vs CWSI	0,80***	36	-0,277	-0,102

R² = coeficiente de determinación; n = número de datos; T_c = temperatura de la copa; ΔT = diferencia entre la temperatura de la copa y la del aire circundante; CWSI = crop water stress index; *** significativo a $P \leq 0,001$.

Assessment of water status indicators in lime trees

Evaluación de indicadores de estado hídrico en limeros

A.B. Mira-García*, W. Conejero, J. Vera, M.C. Ruíz-Sánchez

Dpto. Riego. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS- CSIC). Campus de Espinardo, Apartado de correos 164, 30100 Murcia. Spain

*abmira@cebas.csic.es

Abstract

In this work was evaluated the capability to detect water stress of different water status indicators in young lime trees (*Citrus latifolia* Tan., cv. Bearss) cultivated in ridges and without ridges at the field station of CEBAS-CSIC in Murcia. Two irrigation treatments were applied: Control (well irrigated) and Drought (withholding irrigation). Soil water status was determined continuously by measure soil water content (SWC) and soil matric potential (SMP). Plant water status was assessed by measuring the stem water potential (Ψ_{stem}) and gas exchange. Plant and soil water status not showed significant differences between the crop systems evaluated. Trees subjected to drought showed a progressive decrease of the SWC, SWP and Ψ_{stem} . Cultivation on ridges did not significantly affect the behavior of the indicators studied. Real time soil water status allows identifying the beginning and the recovery of the plant water stress. The combined use of soil water content and soil matric potential allows to manage the irrigation in precision.

Keywords: plant water status; precise irrigation; soil matric potential; soil water content.

Resumen

En este trabajo se evaluó la capacidad para detectar el estrés de diferentes indicadores de estado hídrico en limeros jóvenes (*Citrus latifolia* Tan., cv. Bearss) cultivados en meseta y sin meseta en la finca experimental del CEBAS-CSIC, Murcia. Se aplicaron dos tratamientos de riego: Control (bien regado) y Sequía. El estado hídrico del suelo se determinó en continuo con medidas del contenido volumétrico de agua (θ_v) y del potencial matricial (Ψ_m). El estado hídrico de la planta se evaluó con medidas del potencial hídrico de tallo (Ψ_{tallo}) y del intercambio gaseoso. El estado hídrico de suelo y planta no mostró diferencias significativas entre los sistemas de cultivo evaluados. Los árboles sometidos a sequía mostraron una disminución progresiva del θ_v , Ψ_m y Ψ_{tallo} . El cultivo en meseta no afectó significativamente al comportamiento de los indicadores estudiados. El registro en tiempo real del estado hídrico del suelo facilitó la identificación del inicio y recuperación del estrés hídrico en la planta. El uso combinado del contenido volumétrico de agua en el suelo y del potencial matricial permite realizar un manejo del riego en precisión.

Palabras clave: contenido de agua en el suelo; estado hídrico de la planta; potencial matricial; riego en precisión.

1. INTRODUCCIÓN

La Región de Murcia es una de las principales regiones productoras de lima del país [1]. El desarrollo de este cultivo en la Región se ve limitado principalmente por la escasez de recursos

hídricos. Ante este panorama de déficit hídrico, se hace necesario un manejo del riego de precisión con el fin de reducir el consumo de agua.

El uso de indicadores fisiológicos en la programación del riego, permite ajustar el agua aplicada a la que la planta necesita en cada momento, aumentando así la eficiencia de uso del agua. El potencial hídrico de hoja y/o tallo es uno de los indicadores fisiológicos de estado hídrico más robustos tal y como se han demostrado en otros estudios [2]. Igualmente, el uso de sensores de registro continuo del estado hídrico del suelo, adecuadamente calibrados e instalados y en la zona de absorción radical, ha sido propuestos para la programación precisa del riego [3].

El uso de estos indicadores permite conocer el nivel de estrés hídrico del cultivo, anticipándose ante situaciones de estrés que puedan provocar mermas en la producción o en la calidad de la fruta obtenida [4]. Para el correcto uso de estos indicadores es necesario conocer su capacidad para detectar situaciones de estrés hídrico, la cual puede variar en función de diversos factores como el sistema de cultivo, la forma de imposición del estrés, la textura del suelo o el estado fenológico del cultivo, entre otros.

El objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad para detectar el estrés de diferentes indicadores de estado hídrico de suelo y planta en limeros jóvenes cultivados en: meseta y sin meseta.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se llevó a cabo los meses de septiembre y noviembre de 2018 en limeros (*Citrus latifolia* Tan., cv. Bearss) de 3 años de edad, injertados sobre *Citrus macrophylla* L., en una parcela de la finca experimental del CEBAS-CSIC, Murcia. El marco de plantación es de 6 m x 5 m y el sistema de riego consiste en una doble línea portagoteros, con 4 goteros de 4 L h⁻¹ por árbol.

Para el ensayo se seleccionaron dos parcelas: una con cultivo en meseta y otra sin meseta, en las que se establecieron dos tratamientos de riego: Control y Sequía. Los árboles del tratamiento Control fueron regados al 100% de la ET_c (evapotranspiración del cultivo), mientras que los árboles del tratamiento Sequía fueron sometidos a supresión del riego durante 48 días, y regados al 100% de la ET_c durante el período de recuperación. Cada tratamiento contaba con un total de 13 árboles, realizándose las medidas en los 4 árboles centrales, el resto fueron considerados árboles bordes.

El estado hídrico del suelo se evaluó en continuo con medidas del contenido volumétrico de agua (θ_v) con sondas EnviroPro situadas a 10, 30, 40, 50 y 80 cm de profundidad y del potencial matricial (Ψ_m) con sensores Watermark, situados a 20, 40 y 60 cm de profundidad. Ambos instalados a 10 cm del gotero.

El estado hídrico de la planta se evaluó con medidas puntuales a mediodía solar del potencial hídrico de tallo (Ψ_{tallo}), con una cámara de presión en hojas sombreadas, las cuales fueron tapadas con papel de aluminio al menos dos horas antes de la medida [5]. El intercambio gaseoso se determinó a primera hora de la mañana, en un número similar de hojas soleadas, con un medidor portátil de fotosíntesis (LICOR LI-6400).

Los parámetros agroclimáticos fueron registrados en tiempo real por una estación climática situada en la misma finca (http://www.cebas.csic.es/general_spain/est_meteo.html).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el ensayo las condiciones meteorológicas registradas fueron características del otoño en climas mediterráneos (déficit de presión de vapor (DPV) medio diario en torno a -1,2 kPa (datos no mostrados)). A su vez, en la fase de supresión del riego, se registraron ligeros

eventos de precipitación (≈ 30 mm) (Fig. 1A), que junto a la baja demanda climática (evapotranspiración de referencia media diaria (ET_0) de 2,3 mm (Fig. 2A)), propiciaron el desarrollo de un estrés hídrico ligero.

La monitorización del estado hídrico del suelo permitió observar una disminución progresiva del θ_v y del Ψ_m en el perfil medio (0-50 cm) desde el inicio del estrés y significativa a partir de los 10 días de estrés (Fig. 1A y 1B). Tras una semana de supresión del riego, la tensión matricial de agua en el suelo en los perfiles más superficiales (20-40 cm) alcanzó valores próximos a -160 kPa, mientras que a 60 cm de profundidad los valores fueron similares a los del tratamiento Control, requiriendo 7 días más para disminuir por debajo de -80 kPa (Fig. 1B). La captación de agua por la planta fue análoga a la observada con θ_v , más rápida en los horizontes más superficiales, siendo estos los que más afectados resultaron por los episodios de lluvia (Fig. 1A). Tras el periodo de estrés los árboles del tratamiento Sequía fueron regados de igual forma que el tratamiento Control, necesitando de 5-6 días hasta alcanzar sus valores iniciales (Fig. 1A y 1B).

El estado hídrico de los árboles del tratamiento Control mostró valores altos de potencial hídrico de tallo durante el periodo experimental y sin diferencias significativas entre condiciones de cultivo (Fig. 2B). En contraste, la supresión del riego provocó un descenso de Ψ_{tallo} hasta alcanzar valores mínimos de -0,91 MPa y -1,02 MPa al final del período de estrés (DDA 297), en las plantas cultivadas en meseta y sin meseta, respectivamente (Fig. 2B). Estos valores son indicadores de una situación de estrés hídrico ligero, ya que, los cítricos pueden soportar situaciones severas de sequía, con valores de potencial hídrico foliar al alba de hasta -5 MPa [6]. La disminución de Ψ_{tallo} en los árboles del tratamiento sequía fue significativa, con respecto a los árboles del tratamiento Control, a las 2 semanas del inicio del estrés y más acusada en los árboles cultivados sin meseta (Fig. 2B). Es importante señalar que en este momento se produce a su vez una ralentización en la disminución del contenido de agua en el suelo (θ_v). Este punto de inflexión puede ser empleado como indicador del inicio del estrés hídrico en la planta [7]. Los parámetros de intercambio gaseoso mostraron ligeras reducciones con la supresión del riego, pero con una gran variabilidad en las medidas (datos no mostrados).

4. CONCLUSIONES

El cultivo en meseta no modificó significativamente el comportamiento de los indicadores de estado hídrico del suelo y de las plantas estudiadas, tanto en condiciones de adecuado suministro hídrico como en condiciones de sequía, comparado con el cultivo sin meseta. El potencial hídrico de tallo es el indicador en planta más robusto para detectar situaciones de estrés hídrico. El registro continuo y en tiempo real de los sensores de estado hídrico del suelo facilitó la identificación del inicio y de la recuperación del estrés hídrico en la planta de forma precisa. El uso combinado del contenido volumétrico de agua en el suelo y de su potencial matricial permite interpretar el movimiento de agua en el suelo, y por lo tanto tomar decisiones de manejo del riego con mayor precisión.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado con proyectos del Plan Nacional-FEDER (AGL2016-77282-C03-1R) y de la fundación Séneca de la Región de Murcia (19903/GERM/15).

6. REFERENCIAS

- [1] Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA). Encuesta sobre Superficies y Rendimientos Cultivos (2018) (ESYRCE). <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/esyrce/>
- [2] García-Orellana Y., Ortuño M.F., Conejero W., Ruiz-Sánchez M.C. 2013. Diurnal variations in water relations of deficit

irrigated lemon trees during fruit growth period. Spanish J. Agric. Res. 11(1): 137-145.

[3] Vera J., Conejero W., Conesa M.R., Ruiz-Sánchez M.C. 2019. Irrigation Factor approach based on soil water content: a nectarine orchard study case. Water 11 (3): 589.

[4] Domingo R., Ruiz-Sánchez M.C., Sánchez-Blanco M.J., Torrecillas A. 1996. Water relations, growth and yield of Fino lemon trees under regulated deficit irrigation. Irrig. Sci. 16: 115-123.

[5] Hsiao, T. C. 1990. Measurements of plant water status. En: Irrigation of Agricultural Crops (Monograph no. 30). Eds, B. A. Stewart y D. R. Nielsen. (American Society of Agronomy, Madison). Pág. 243-279.

[6] Ruiz-Sánchez M.C., Vera J., Conejero W., Mira-García A.B., Ortuño M.F. 2018. Indicadores de balance hídrico en limeros jóvenes. Comunicación presentada en: XXXVI Congreso Nacional de Riegos (Valladolid, España, AERYD) Pág. 5.

[7] Ruiz-Sánchez M.C., Domingo R., Savé R., Biel C., Torrecillas A. 1997. Effects of water stress and rewatering on leafwater relations of lemon plants. Biol. Plant. 39: 623-631.

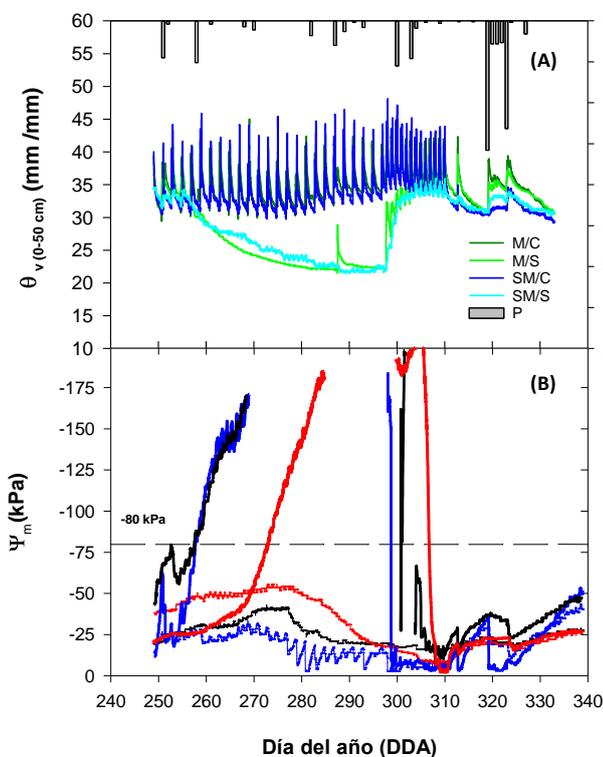


Figura 1. Evolución de la precipitación (P), el contenido de agua en el suelo (θ_v) en el perfil medio 0-50 cm en los tratamientos Control y Sequía en meseta y sin meseta (A) y del potencial matricial (B) a 20 cm (azul), 40 (negro) y 60 cm (rojo) en el tratamiento Control (trazo fino) y Sequía (trazo grueso) del cultivo en meseta, durante el periodo experimental.

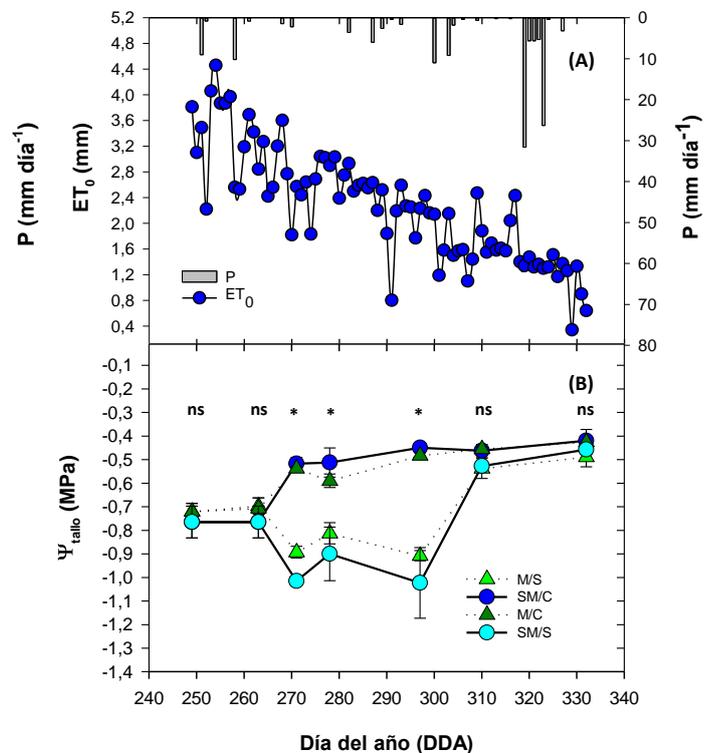


Figura 2. Evolución de la evapotranspiración de referencia diaria (ET_0) y de la precipitación (P) (A) y del potencial hídrico de tallo (Ψ_{tallo}) (B) durante el periodo experimental. Cada punto es la media de 4 repeticiones. Las barras verticales sobre los puntos son el error estándar ($\pm ES$). ns: no significativo, * indica diferencias significativas según el test de la MDS ($p < 0,05$).

Physiological responses induced by different rootstocks against the infestation of *Meloidogyne incognita* in a greenhouse pepper crop

Respuestas fisiológicas inducidas por diferentes porta-injertos frente a la infestación de *Meloidogyne incognita* en un cultivo de pimiento en invernadero

A. Gálvez^{1*}, F.M. Del Amor¹, C. Ros², J. López-Marín¹

¹Departamento de Producción Vegetal y Agrotecnología. Equipo de Horticultura. IMIDA. La Alberca. Murcia. Spain

²Departamento de Protección de Cultivos. Equipo de Protección de Cultivos. IMIDA. La Alberca. Murcia. Spain

*1297@coitarm.es

Abstract

In the pepper greenhouses of Campo de Cartagena (Murcia) *Meloidogyne incognita* is widely distributed and after the elimination of methyl bromide, it has become an emerging problem in more than 40% of greenhouses. The use of resistant rootstocks has proved to be a viable technique for dealing with *Meloidogyne incognita* in several crops (tomato, melon, watermelon, etc.). However, little research has been done on the physiological and nutritional effect of pepper grown in greenhouses under Mediterranean climate conditions. Therefore, we studied a susceptible variety (Gacela) grafted on resistant rootstocks (C19, C25 and RT17), and compared it with non-grafted and autografted (GAL) plants. Total phenols and carotenoids were significantly affected, as was the amino acid profile. These results provide new insights into traits that can identify nematode-resistant rootstocks, and therefore new tools to induce resistance, while avoiding the use of soil disinfectants.

Keywords: *Capsicum annuum* L.; biotic stress; resistance genes; grafting; Gacela.

Resumen

En los invernaderos de pimiento del Campo de Cartagena (Murcia) *Meloidogyne incognita* está ampliamente distribuido y tras la eliminación del bromuro de metilo, se ha convertido en un problema emergente en más del 40% de los invernaderos. El uso de porta-injertos resistentes ha demostrado ser una técnica viable para lidiar con *Meloidogyne incognita* en varios cultivos (tomate, melón, sandía, etc.). Sin embargo, se ha investigado poco acerca del efecto fisiológico y nutricional del pimiento cultivado en invernadero en condiciones de clima mediterráneo. Por lo tanto, estudiamos una variedad susceptible (Gacela) injertada en porta-injertos resistentes (C19, C25 y RT17), y la comparamos con las plantas no injertadas y autoinjertadas (GAL). Los fenoles totales y carotenoides se vieron afectados significativamente, al igual que el perfil de aminoácidos. Estos resultados proporcionan nuevos conocimientos en los rasgos que pueden identificar porta-injertos resistentes a nematodos, y por lo tanto nuevas herramientas para inducir resistencia, mientras que evitamos el uso de desinfectantes de suelo.

Palabras clave: *Capsicum annuum* L.; estrés biótico; genes de resistencia; injerto; Gacela.

1. INTRODUCCIÓN

Los nematodos del género *Meloidogyne* son uno de los principales patógenos de los cultivos protegidos debido a los daños que ocasionan en sus raíces, impidiendo a la planta una correcta absorción de agua y nutrientes, y provocando pérdidas de cosecha que representan entre un 10 y un 15% de promedio [1], pudiéndose alcanzar entre un 30 y un 60% en suelos altamente infestados. Aunque el uso del injerto como técnica de propagación de plantas ha sido usado durante muchos siglos en plantas de hoja perenne no queda muy claro cómo actúan los mecanismos fisiológicos en el restablecimiento de los tejidos en la unión del injerto. Durante el siglo XX, el uso generalizado del injerto principalmente en especies pertenecientes a cucurbitáceas y solanáceas, llevaron a significativos avances de aspectos fisiológicos de herbáceas injertadas [2]. El objetivo de este trabajo fue obtener información sobre los mecanismos por los cuales las plantas injertadas son capaces de superar el deterioro de los efectos perjudiciales producidos por nematodos e identificar los mecanismos de respuestas fisiológicas que les confieren esta tolerancia diferencial en un cultivo de pimiento en invernadero.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal y condiciones del invernadero

Se evaluaron plantas de la variedad Gacela 'F1' (Syngenta Seeds) autoinjertadas (GAL) e injertadas sobre 3 porta-injertos: Atlante (C25) y C19 (Ramiro Arnedo Seeds S.A.) y Robusto (RT17) (Syngenta Seeds S.A.). Plantas de Gacela sin injertar e injertadas sobre los mismos porta-injertos sin inocular, se usaron como control. Cada planta se cultivó individualmente en macetas de 10 L y se infestó con 2400 J2 de nematodos de una población de *M. incognita* obtenida de una sola masa de huevos de raíces de Atlante infestadas de forma natural [3].

2.2 Concentración mineral

Los frutos de pimiento se secaron en estufa a 65°C durante 72 h. Los cationes se extrajeron con 20 mL de agua desionizada en el material vegetal molido (0,4 g) y se determinaron por espectrometría de emisión de plasma óptico acoplado inductivamente (ICP-OES) (Varian Vista-MPX, Varian Australia, Mulgrave, Victoria, Australia).

2.3 Compuestos fenólicos totales y carotenoides

Los fenoles totales se determinaron de acuerdo a la metodología descrita por Piñero *et al.* [4]. Los carotenoides se calcularon de acuerdo con Almela *et al.* [5], utilizando un estándar comercial de β -caroteno de Sigma (Madrid, España).

2.4 Aminoácidos libres

Los aminoácidos libres se extrajeron de los frutos (-80°C): la savia se extrajo tras centrifugación a 5000 g (10 min, 4°C) y se analizó con el método AccQ.Tag-ultra (UPLC) (Waters, UPLC Amino Acid Analysis Solution. Waters Corporation, Milford, MA, 2006) según metodología descrita por Piñero *et al.* [6].

2.5 Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue en bloques al azar de 4 bloques por 5 repeticiones. Se calcularon las diferencias significativas por ANOVA y las medias se compararon con una probabilidad de $P \leq 0,05$ de acuerdo al test Duncan.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las plantas inoculadas, los porta-injertos menos susceptibles, RT17 y C19, dieron concentraciones de Ca más altas que en las plantas sin injertar y autoinjertadas (GAL) (Tabla 1). La concentración de Ca en productos hortícolas se ha relacionado con la captación de agua [7],

nuestros resultados indican que los efectos significativos de la inoculación en la regulación estomática afectaron claramente a la absorción de Ca y redujo su concentración en frutos en porta-injertos susceptibles, y especialmente en las plantas no injertadas. Sin embargo, este patrón se invirtió para Na, B y Mn: RT17 y C19 mostraron concentraciones más bajas en comparación con las plantas no injertadas o autoinjertadas (GAL). Con respecto a la concentración de fenoles totales en los frutos, se encontraron diferencias significativas entre los porta-injertos estudiados (Fig. 1a). Así la respuesta de las plantas a la inoculación con nematodos aumentó en un 34% los fenoles totales para las plantas no injertadas, y en un 37% y 33% respectivamente para GAL y C25 cuando se compararon con las plantas no inoculadas. Sin embargo, este aumento en los fenoles totales se atenuó para C19, y el nivel en RT17 no se vio afectado por la inoculación, lo que concuerda con investigaciones recientes sobre tomate [8]. Los carotenoides totales (Fig. 1b) mostraron una respuesta similar a la inoculación, los porta-injertos C19 y RT17 no se vieron afectados. Otros estudios de nematodos y carotenoides mostraron resultados similares [9]. Sin embargo, Arimboor *et al.* [10], han indicado que esos cambios en el contenido y estructura de los carotenoides en plantas pueden ser marcadores de estrés ambiental, lo que concuerda con nuestros resultados. El efecto del injerto sobre la concentración total de aminoácidos fue relevante en la ausencia de inoculación (Tabla 1). Aunque el efecto más destacado fue en RT17, que obtuvo concentraciones más altas de Gly y Met que el resto de los tratamientos. Además, las plantas sin injertar tenían los niveles más altos de Thr, Cys, Lys, Val, Leu y Phe. Por lo tanto, las concentraciones más altas en las plantas no injertadas se redujeron significativamente, específicamente para Gly, Thr, Ala, Cys, Val, Ile, Leu y Phe; en contraste, Pro fue el único aminoácido cuya concentración aumentó debido a la inoculación en estas plantas, y la misma respuesta se encontró en plantas autoinjertadas (GAL). Pratelli y Pilot han demostrado que la infección por patógenos conlleva a cambios específicos en la expresión de muchos genes involucrados en el metabolismo y transporte de aminoácidos [11].

4. CONCLUSIONES

La regulación de la captación y el transporte de agua vinculados con el control nutricional para contrarrestar la reducción de la captación de Ca, P y Cu- junto con el objetivo de la adición exógena de aminoácidos, cuyos niveles se deterioraron significativamente después de la infestación, debe ser parte de la solución para mejorar la tolerancia a *M. incognita* en pimiento.

5. REFERENCIAS

- [1] Bello, A. P., Escuer, M., Pastrana, M.A. 1996. Nematodos fitoparásitos y su control en ambientes mediterráneos. En: Patología vegetal Tomo II, eds. (Llácer, G., López, M.M., Trapero, A y Bello, A., Sociedad Española de Fitopatología), p.1039-1069.
- [2] Goldschmidt, E.E. 2014. Plant grafting: new mechanisms, evolutionary implications. *Front. Plant Sci.* 5, 727.
- [3] Robertson, L., López-Pérez, J.A., Bello, A., Díez-Rojo, M.A., Escuer, M., Piedra-Buena, A., Ros, C., Martínez, C. 2006. Characterization of *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* and *M. hapla* populations from Spain and Uruguay parasitizing pepper (*Capsicum annuum*). *Crop Prot* 25, 440-445.
- [4] Piñero, MC, Pérez-Jiménez, M., López-Marín, J., Varó, P., del Amor, FM. 2018. Differential effect of the nitrogen form on the leaf gas Exchange, amino acid composition, and antioxidant response of sweet pepper at elevated CO₂. *Plant Growth Regul* <https://doi.org/10.1007/s10725-018-0409-1>.
- [5] Almela L., López-Roca, J. M., Candela, M. E., Alcázar, M. D. 1991. Carotenoid composition of new cultivars of red pepper for paprika. *J. Agric. Food Chem.* 39, 1606-1609.
- [6] Piñero MC, Pérez-Jiménez M, López-Marín J, del Amor FM. 2016. Changes in the salinity tolerance of sweet pepper plants as affected by nitrogen form and high CO₂ concentration. *J Plant Physiol* 200, 18–27.
- [7] Del Amor, F.M., Marcelis, L.F.M. 2006. Differential effect of transpiration and Ca supply on growth and Ca concentration of tomato plants. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 111, 17–23.

[8] Lobna, H., Aymen, E.M., Hajer, R., Naima, M.B., Najet, H.R. 2017. Biochemical and plant nutrient alterations induced by *Meloidogyne javanica* and *Fusarium oxysporum* f.sp.*radicis lycopersici* co-infection on tomato cultivars with differing level of resistance to *M. javanica*. Eur. J. Plant Pathol. 148, 463–472.

[9] Atkinson, N.J., Dew, T.P., Orfila, C., Urwin, P.E. 2011. Influence of combined biotic and abiotic stress on nutritional quality parameters in tomato (*Solanum lycopersicum*). J. Agric. Food Chem. 59, 9673–9682.

[10] Arimboor, R., Natarajan, R.B., Menon, K.R., Chandrasekhar, L.P., Moorkoth, V. 2015. Red pepper (*Capsicum annum*) carotenoids as a source of natural food colors: analysis and stability—a review. J. Food Sci. Technol. 52, 1258–1271.

[11] Pratelli, R., Pilot, G., 2014. Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. J. Exp. Bot. 65, 5535–5556.



Figura 1- Efectos de la inoculación con *M. incognita* sobre fenoles totales (A) y carotenoides (B) en frutos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos. Los valores son las medias ($n = 20 \pm SE$). Análisis de varianza: ns, no significativo; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,001$.

Tabla 1. Efectos de *M. incognita* en las concentraciones de macro y micronutrientes en frutos. Medias en columna seguidas por misma letra no son significativamente diferentes en $p \leq 0,05$, respecto test de múltiples rangos de Duncan ($n=20$). Análisis de varianza: ns, no significativo; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,001$.

Tratamientos		K (mg kg ⁻¹)	Ca (mg kg ⁻¹)	P (mg kg ⁻¹)	Mg (mg kg ⁻¹)	Na (mg kg ⁻¹)	B (mg kg ⁻¹)	Fe (mg kg ⁻¹)	Cu (mg kg ⁻¹)	Mn (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)										
Sin inocular	Sin injertar	33997,1	ab	31524,5	ab	2857,4	ab	15078,0	a	294,2	a	130,0	bc	250,1	b	1,93	ab	48,4	bc	68,1	cd
	GAL	40648,9	bc	31070,6	ab	3672,0	c	15770,1	ab	348,1	a	121,2	bc	188,6	a	3,42	cd	63,6	d	71,3	d
	C19	39232,7	bc	34916,3	b	3459,0	bc	16798,5	ab	273,7	a	96,5	a	165,3	a	3,35	cd	36,4	ab	42,9	a
	C25	39030,7	bc	35090,0	b	3868,7	c	16269,4	ab	255,5	a	117,9	abc	173,2	a	3,34	cd	46,6	bc	62,1	bc
	RT17	37861,3	bc	39840,8	c	3510,9	bc	17809,8	bc	259,2	a	105,5	ab	170,9	a	2,55	bc	55,5	c	61,3	bc
Inoculadas	Sin injertar	28262,7	a	28758,6	a	2331,3	ab	17783,3	bc	741,8	bc	165,3	d	210,3	ab	0,81	a	51,3	bc	62,4	bc
	GAL	37508,3	bc	29122,3	a	2746,3	ab	17963,0	bc	1035,3	c	132,2	c	176,5	a	2,21	ab	41,9	c	59,9	bc
	C19	36542,8	b	33573,1	b	2618,0	ab	15902,2	ab	324,9	a	107,6	ab	179,4	a	1,10	ab	35,1	a	38,9	a
	C25	37415,9	b	31337,6	ab	3007,0	ab	16529,6	ab	494,5	ab	123,7	bc	157,1	a	2,99	bc	40,3	ab	56,7	bc
	RT17	45380,8	c	34447,6	b	3849,4	c	19970,4	c	354,4	a	107,2	ab	179,5	a	4,32	d	53,0	a	53,7	b
Porta-injertos	ns	*	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Nemátodos	*	**	***	*	*	*	**	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Porta-injertos*Nemátodos	**	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	*	ns	*	ns	*	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tabla 2. Efectos de la inoculación con *M. incognita* en las concentraciones aminoácidos.

Tratamientos		Gly	Thr	Ala	Pro	Cys	Lys	Met	Val	Ile	Leu	Phe											
Sin inocular	Sin injertar	81,3	cd	264,3	c	296,8	c	55,8	bc	388,1	c	459,8	c	10,4	bc	356,0	d	154,2	d	134,2	e	55,8	e
	GAL	61,1	abc	224,8	b	279,5	c	49,3	a	262,9	ab	308,1	a	12,3	cd	242,7	c	128,3	cd	84,4	bc	39,4	bc
	C19	56,0	abc	155,8	b	195,1	b	51,3	ab	198,3	a	306,6	a	10,8	cde	243,8	c	146,1	d	76,0	ab	48,9	c
	C25	52,3	abc	164,2	b	171,3	b	56,6	bc	225,6	a	319,2	ab	8,5	abc	228,6	bc	96,8	ab	95,9	bc	36,8	ab
	RT17	91,5	d	215,4	b	326,6	c	48,2	a	245,5	ab	318,9	ab	17,9	d	245,8	c	108,1	bc	101,4	cd	52,1	d
Inoculadas	Sin injertar	42,0	ab	129,3	a	135,3	a	68,8	e	210,0	a	469,4	c	7,2	ab	183,1	ab	108,6	bc	93,6	bc	37,8	ab
	GAL	51,5	abc	161,7	b	115,0	a	69,9	e	246,4	ab	428,7	bc	5,4	a	212,9	abc	91,8	ab	112,0	de	33,6	ab
	C19	71,9	bcd	149,9	a	275,4	c	60,3	cd	331,2	bc	373,3	abc	5,4	a	215,2	abc	111,0	bc	107,4	cd	30,0	a
	C25	38,1	a	136,4	a	173,8	b	66,3	b	179,3	a	361,2	abc	5,5	a	168,9	a	79,0	a	68,3	a	32,1	ab
	RT17	46,1	ab	148,2	a	164,7	b	51,7	b	198,4	a	367,6	abc	14,4	cd	193,8	abc	86,9	ab	79,3	ab	33,6	ab
Porta-injertos	ns	*	ns	*	*	*	**	ns	**	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Nemátodos	**	***	*	***	ns	ns	ns	**	***	*	ns	**	***	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Porta-injertos*Nemátodos	ns	**	ns	ns	**	ns	ns	ns	***	ns	*	ns	***	ns	*	ns	*	ns	*	ns	*	ns	ns

ORAL SESSION III:
Agrifood Biotechnology

Silencing of the *GIGANTEA1* gene in *Petunia hybrida* affects the vegetative development

El silenciamiento del gen *GIGANTEA1* en *Petunia hybrida* afecta el desarrollo vegetativo

C. Brándoli^{1*}, M. Egea Cortines¹, C. Petri², J. Weiss¹

¹Instituto de Biotecnología Vegetal (IBV)–Universidad Politécnica de Cartagena, c. Linterna s/n, 30203, Cartagena. Spain

²Departamento de Fruticultura. Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea – CSIC, Avenida Dr. Wienberg, s/n, 29750, Málaga. Spain

*claudio.brandoli@gmail.com

Abstract

Plants have developed a complex organization to cope with environmental changes, synchronizing their physiological processes and metabolism with the rotation of the Earth's axis. This rhythm is regulated by the circadian clock, an intricate system based on a set of genes called the oscillator, forming several feedback loops of transcription and translation. *GIGANTEA* (*GI*), a plant-specific nuclear protein, is a gene belonging to the evening loop of the circadian gene regulatory system. This gene is characterized by its pleiotropic actions, including flowering time, growth and defense against pathogens. Here we show how the specific silencing of the *GI* gene, through the RNA-interference technique, affects the vegetative development in *Petunia*.

Keywords: RNA-interference; circadian clock; vegetative development.

Resumen

Las plantas han desarrollado una organización compleja para hacer frente a los cambios ambientales, sincronizando sus procesos fisiológicos y metabolismo con la rotación del eje de la Tierra. Este ritmo está regulado por el reloj circadiano, un intrincado sistema basado en un conjunto de genes llamado oscilador, que forma varias respuestas cíclicas de transcripción y traducción. *GIGANTEA* (*GI*), una proteína nuclear específica de la planta, es un gen que pertenece al ciclo de la tarde del sistema génico, que regula el ritmo circadiano. Este gen se caracteriza por sus acciones pleiotrópicas, que incluyen el tiempo de floración, el crecimiento y la defensa contra patógenos. Aquí mostramos cómo el silenciamiento específico del gen *GI*, a través de la técnica de interferencia de ARN, afecta el desarrollo vegetativo en *Petunia*.

Palabras clave: ARN de interferencia; reloj circadiano; desarrollo vegetativo.

1. INTRODUCCIÓN

Gracias a la capacidad de reconocer los cambios estacionales, las plantas aumentan sus posibilidades de supervivencia, seleccionando el momento del año más favorable para la floración, y de esta manera aumentando las posibilidades de éxito reproductivo [1].

Hasta ahora, la mayoría de los estudios genéticos moleculares se han realizados usando la planta modelo *Arabidopsis thaliana* [2][3], demostrando que la floración fotoperiódica y la regulación del reloj circadiano comparten elementos comunes, como los receptores de luz y las proteínas que forman el temporizador circadiano. Gracias a estos estudios sabemos que GI estabiliza ZEITLUPE (ZTL) [4], una proteína F-box conocida por poseer un dominio de detección de luz azul [LUZ, OXÍGENO, VOLTAJE (LOV)] en el extremo N, que facilita su estabilidad. Facilitando la maduración de ZTL en su forma activa, GI, a través de su actividad de proteína chaperona, le permite degradar TIMING OF CAB 1 (TOC1) y PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 5 (PRR5) por degradación proteasomal [5] ayudando a mantener una alta amplitud de oscilación de estos genes a lo largo del día. En este trabajo, hemos caracterizado el gen *GI1* en *Petunia x hybrida* y creado plantas transgénicas con pérdida de función, a través del método de ARN de interferencia.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento

Fueron recolectadas semillas de *Petunia x hybrida* (familia Solanáceas), de la variedad doble haploide 'Mitchell'. Las plantas fueron cultivadas en una cámara de crecimiento en condiciones estacionarias de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad, una intensidad luminosa de 20-25 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y una temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.2 Diseño y construcción molecular del vector RNAi

A través de una serie de PCR se seleccionó la región de *GI* codificante para *GI1* y se insertaron secuencias attB1 y attB2 para la recombinación a través del método de clonación Gateway® (<https://www.thermofisher.com/>). El amplicón de 225 bp, se recombinó primero en el vector de clonación pDONR201 (Invitrogen) y después en el plásmido binario pHellsgate12 para inducir la formación de estructuras de doble hebra de ARN en forma de horquillas. El gen *nptII*, presente entre los bordes derecho e izquierdo del ADN-T del plasmido binario, fue usado como gen marcador de selección bajo el control del promotor CaMV 35S.

Las construcciones se comprobaron mediante PCR y los productos se evaluaron por análisis en gel de agarosa al 1%. Los cebadores utilizados están enumerados en la tabla 1. Para la transformación en planta se aplicó la cepa desarmada EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*.

2.3 Generación de las líneas *iRNA::PhGI1*

Para la transformación se utilizó la cepa desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. El protocolo de transformación fue desarrollado por el laboratorio de Tom Gerats (Nijmegen) y reúne también la experiencia de Peter de Groot (Nijmegen) y Dave Clark (University of Florida), [6][7]. La transformación genética de las plantas se confirmó mediante PCR y análisis de Southern Blot [8]. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 3 minutos a 95°C , seguidos de 15 segundos a 95°C , 15 segundos a 55°C y 15 segundos a 72°C por 35 ciclos y 5 minutos a 72°C (Kapa Biosystems).

2.4 Muestreo y análisis estadístico

Para el análisis fenotípico, se consideraron diferentes aspectos vegetativos como el tamaño de las hojas, la longitud del entrenudo y el número de meristemos axilares. El análisis estadístico se realizó entre tres y cuatro líneas T1 independientes silenciadas por el gen *PhGI1*, tres plantas de tipo silvestre y tres plantas "siblings" no transgénicas. Los datos sobre las hojas son el promedio de tres hojas por planta.

3. RESULTADOS

Se obtuvieron 3 líneas *iRNA::PhGI1* transgénicas independientes, denominadas 3.7, 4.7 y 8.1. Las hojas basales y apicales de las líneas transgénicas de *PhGI1* se mostraron significativamente más largas y anchas, particularmente en la zona apical, en comparación con las de tipo silvestre y de los “siblings” no transgénicas (Fig. 1; Fig. 2a). Las plantas transgénicas mostraron una mayor dominancia apical, caracterizada por una reducción promedia de la longitud entrenudo y a una porcentual de meristemas axilares a lo largo de la planta, dando como resultado un fenotipo más espeso comparado con las plantas control (“WT” y “siblings”) (Fig. 2b)(Tabla 2). Estas características subrayan un importante cambio estructural en el hábito de crecimiento.

4. CONCLUSIONES

Nuestros resultados demuestran que GI1 está involucrado en el desarrollo vegetativo de *Petunia* y que su silenciamiento provoca un cambio en la organización estructural de la planta, caracterizado por un marcado predominio apical.

5. AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer al Instituto de Biotecnología Vegetal (IBV), especialmente a mi director y a mis codirectores de tesis, la Dr. Julia Weiss, al Dr. Cesar Petri Serrano y al Dr. Marcos Egea Gutiérrez-Cortines por su disposición y su valioso asesoramiento. También quisiera agradecer la Beca de Especialización Científica y Técnica asociada a actividades de I+D+i de la UPCT (Ref: B-065/16). Esta obra forma parte de los proyectos BFU-2013-45148-R y Seneca 19398/PI/14.

6. REFERENCIAS

- [1] Rubio V., Deng X.W. 2007. Standing on the Shoulders of GIGANTEA. *Plant Sci.* 318(5848):206-207.
- [2] Staiger D., Shin J., Johansson M., Davis S. J. 2013. The circadian clock goes genomic. *Genome Biol.* 14(6), 208.
- [3] Park D. H., Somers D. E., Kim Y. S., Choy Y. H., Lim H. K., Soh M. S., Kim, H. J. 1999. Control of Circadian Rhythms and Photoperiodic Flowering by the Arabidopsis GIGANTEA Gene. *Science.* 285 (5433):1579-1582.
- [4] Kim W., Fujiwara S., Suh S., Kim J., Kim Y., Han L., Somers D. E. 2007. ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature.* 449:356–360.
- [5] Cha J. Y., Kim J., Kim T. S., Zeng Q., Wang L., Lee S. Y., Somers D. E. 2017. GIGANTEA is a co-chaperone which facilitates maturation of ZEITLUPE in the Arabidopsis circadian clock. *Nat. Commun.* 8(1), 1–11.
- [6] Gonzalez I. M.. 2012. Identification of novel genes involved in *Petunia* flower development using transcript profiling and reverse genetics. PhD Thesis, DOI:10.31428/10317/3113
- [7] Manchado-Rojo M., Weiss J., Egea-Cortines, M. 2014. Validation of Aintegumenta as a gene to modify floral size in ornamental plants. *Plant Biotechnol. J.* 12(8):1053-65.
- [8] Southern E.M.. 1985. E. M. SOUTHERN: Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98(3):503-508.

Tabla 1. Cebadores utilizados

PhGi13utrF	TGGAGAAAGGGCAGAGACAT
PhGi13utrR	GTGGAGCCACCCTTACGTT
PhGi13utrFattb1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTGGAGAAAGGGCAGAGACAT
PhGi13utrRattb2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGTGGAGCCACCCTTACGTT
nptII For	CCTGCTTGCCGAATATCATGGTGG
nptII Rev	CGAAATCTCGTGATGGCAGGTTGG

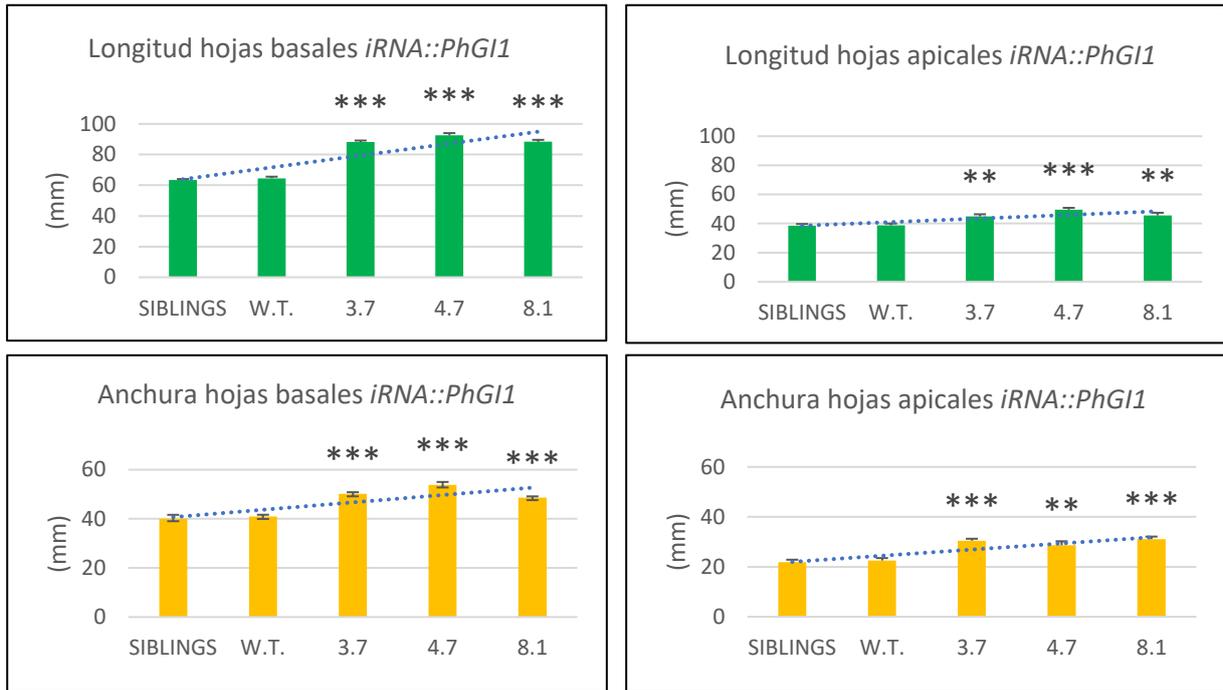


Figura 1. Longitud y anchura de las hojas basales y apicales en tres líneas T1 independientes de *iRNA::PhG11* en comparación con las plantas hermanas no transgénicas de la línea *PhG11.1* y el tipo silvestre. Los asteriscos indican significancia estadística, según la prueba T de Student * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001.

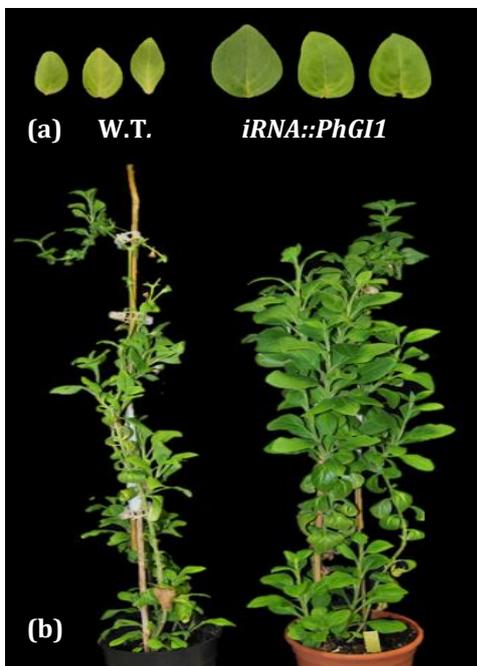


Tabla 2. Comparación de parámetros vegetativos

Genotype	Wild-Type	<i>iRNA:PhG11</i>	% GI1 versus W.T.
Entrenado Basal (mm)	12,61	16,93	+34,4
Entrenado Mediano (mm)	16,30	10,17	-37,6
Entrenado Apical (mm)	20,5	13,60	-33,7
Nº de meristemos axilares	34	78	+129,4

Imagen 1. El hábito de crecimiento vegetativo de las líneas transgénicas en comparación con el tipo silvestre. A la izquierda, una línea de tipo silvestre, a la derecha *iRNA::PhG11* línea 4.8.

Silencing Late Elongated Hypocotyl in snapdragon affects scent emission

El silenciamiento de *Late Elongated Hypocotyl* en boca de dragón modifica la emisión de aromas

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

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

*marta.terry@edu.upct.es

Abstract

Organisms can anticipate periodic changes in their environment thanks to the circadian clock, a complex network of genes that form interlocked loops. Circadian clocks are also active in plants, regulating processes such as growth, development, flowering or scent emission in response to environmental cues. However, the role of the circadian clock in flower rhythms remains poorly understood. Here we analyzed the function of the clock gene *LATE ELONGATED HYPOCOYL (LHY)* concerning scent emission and profile in snapdragon (*Antirrhinum majus*). Silencing *LHY* modified the scent profile of snapdragon flowers.

Keywords: *Antirrhinum majus*; *LHY*; RNA interference; volatile organic compounds.

Resumen

Los organismos son capaces de anticipar los cambios periódicos en su ambiente gracias al reloj biológico, una compleja red de genes que establecen bucles interconectados. Los relojes circadianos también están activos en plantas, regulando procesos como el crecimiento, desarrollo, floración o la emisión de aromas en respuesta al ambiente. Sin embargo, el papel del reloj circadiano en los ritmos de las flores es poco conocido. En el presente trabajo, analizamos la función del gen de reloj *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* en la emisión y el perfil de aromas en boca de dragón (*Antirrhinum majus*). El silenciamiento de *LHY* modificó el perfil aromático de la flor de boca de dragón.

Palabras clave: *Antirrhinum majus*; ARN de interferencia; compuestos orgánicos volátiles; *LHY*.

1. INTRODUCCIÓN

Los organismos están sujetos a cambios periódicos en el ambiente, tales como la alternancia día-noche o las estaciones. Los seres vivos son capaces de anticiparse a estos cambios gracias al reloj biológico, el cual se compone de diversos genes que establecen una serie de bucles interconectados. El reloj circadiano juega un papel fundamental en el control de caracteres agronómicos como resistencia al frío, floración o acumulación de metabolitos de olor y sabor [1]. La generación de mutantes o transgénicas en plantas modelo permite identificar el papel del gen de interés en el desarrollo, floración o emisión de aromas, entre otros. La emisión de compuestos orgánicos volátiles (*VOCs* por sus siglas en inglés) tiene un papel importante ya que éstos pueden actuar como repelentes de herbívoros, antimicrobianos o como atrayentes de polinizadores, siendo los componentes principales del sabor. Además, su emisión varía a lo largo del día,

coincidiendo con la actividad de sus polinizadores [2]. Pese a que se conocen las rutas biosintéticas de estos compuestos, se desconoce qué papel desempeñan los genes del reloj en la regulación de la síntesis y emisión de aromas.

Por ello, el presente trabajo se centra en los efectos del gen reloj *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* en la emisión de aromas en la planta modelo boca de dragón (*A. majus*).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Transformación de *Antirrhinum*

Para silenciar el gen *AmLHY* se clonó un fragmento de 156 pares de bases del mismo, empleando el vector pHELLSGATE12 [3]. Para la transformación se usó la línea silvestre (o *wild-type*, WT) Sippe50 de boca de dragón.

2.2 Material vegetal y condiciones de cultivo

Se utilizaron cuatro grupos de plantas: silvestre y tres líneas transgénicas independientes de generación 2 (T2), denominadas *RNAi:AmLHY14*, *RNAi:AmLHY26* y *RNAi:AmLHY27*. Las líneas se cultivaron en los invernaderos de la Finca Experimental Tomás Ferro. Las plantas transgénicas se identificaron mediante PCR con cebadores específicos (*NPTII*, sentido: CCTGCTTGCCGAATATCATGGTGG, antisentido: CGAAATCTCGTGATGGCAGGTTGG) y de acuerdo al protocolo de la polimerasa (KAPABIOSYSTEMS). Las plantas se trasladaron a una cámara de cultivo días antes de la toma de muestras, donde fueron aclimatadas a un ciclo de 12 horas de luz a 23°C y 12 horas de oscuridad a 18°C. El inicio del día se definió como ZT0 (*Zeitgeber time*).

2.3 Expresión génica

Se tomaron hojas completamente desarrolladas de los cuatro grupos de plantas. Cada grupo se componía de 3-4 plantas. El tejido fue congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -80°C hasta la posterior extracción de ARN. La extracción de ARN total se realizó según [4]. Para la síntesis de ADN complementario se procedió según lo indicado por el fabricante (Maxima Reverse Transcriptase, Thermo Scientific). Para la PCR a tiempo real o cuantitativa (qPCR) se empleó el sistema Mx3000P (Agilent Technologies) y SYBR Green Master Mix (Takara, Clontech), según los respectivos manuales. Como gen de referencia se usó *UBIQUITIN (AmUBI)*, sentido CCGATGGAAGTATATGTTTGG y antisentido CCAGTCTTACAAGACCTAGAAGCTC, los cebadores de *AmLHY* fueron TTA CTTGCTCTCCGGCAACT (sentido) y TTGAAGTCACAAGCTGATTGC (antisentido). La expresión génica se calculó con el método $\Delta\Delta Ct$ [5].

2.4 Emisión de volátiles

La recolección de volátiles se realizó según lo descrito por [6], utilizando un desecador de vidrio. Cada réplica biológica constaba de una flor cortada de 2-3 días de edad. Se muestrearon 3-4 flores de los grupos de plantas silvestres y transgénicas. El muestreo se llevó a cabo cada 6 horas durante un ciclo de 24 horas. La cuantificación se desarrolló en base a protocolos publicados [7].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La expresión de *AmLHY* fue significativamente inferior en las líneas transgénicas (t de Student $p < 0,05$, Fig. 1). El perfil, definido como el número de compuestos detectados y la contribución de cada uno de ellos, varió entre los distintos grupos de plantas. Las flores de las líneas de RNAi mostraron un perfil más complejo (datos no mostrados). En este trabajo se muestran cuatro VOCs comunes a todos los grupos de plantas: 3,5-dimetoxitolueno, acetofenona, metil benzoato y ocimeno. En la línea silvestre, la emisión de ocimeno y 3,5-dimetoxitolueno aumentó durante el día, la de metil benzoato aumentó durante la noche y la acetofenona se

mantuvo con pocas variaciones (Fig. 2A). Sin embargo, observamos una serie de diferencias entre silvestres y líneas RNAi. Primero, la emisión total, expresada como área/peso fresco, disminuyó en las líneas transgénicas. La contribución del 3,5-dimetoxitolueno disminuyó en las líneas *RNAi:AmLHY14* y *RNAi:AmLHY26* mientras que la proporción de acetofenona y ocimeno fue mayor en dichas líneas (Fig. 2B-2C). Por otro lado, la línea *RNAi:AmLHY27* mostró un perfil distinto, la proporción de 3,5-dimetoxitolueno y metil benzoato fue mayor mientras que presentó los niveles más bajos de acetofenona y ocimeno. Estudios previos sobre el silenciamiento de genes del reloj mostraron una alteración en la emisión de VOCs, incluyendo cambios en la cantidad emitida [8] y en el perfil aromático [9]. Estos cambios podrían alterar las interacciones con polinizadores, herbívoros e incluso planta-planta.

4. CONCLUSIONES

El silenciamiento de *AmLHY* modifica la complejidad del perfil aromático en las flores de boca de dragón así como la contribución de cada volátil al aroma.

5. AGRADECIMIENTOS

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

6. REFERENCIAS

- [1] Hoballah M.E., Stuurman J., Turlings T.C., Guerin P.M., Connetable S., Kuhlemeier C. 2005. The composition and timing of flower odour emission by wild *Petunia axillaris* coincide with the antennal perception and nocturnal activity of the pollinator *Manduca sexta*. *Planta*. 222(1): 141-150.
- [2] Egea-Cortines M., Ruiz-Ramon F., Weiss J. 2013. Circadian Regulation of Horticultural Traits: Integration of Environmental Signals. *Hortic. Rev.* 41: 1-46.
- [3] Helliwell C., Waterhouse P. 2003. Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods*. 30(4): 289-295.
- [4] Box M.S., Coustham V., Dean C., Mylne J.S. 2011. Protocol: A simple phenol-based method for 96-well extraction of high quality RNA from *Arabidopsis*. *Plant. Methods*. 7(1): 7.
- [5] Schmittgen, T.D., Livak, K.J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3(6): 1101.
- [6] Manchado-Rojo M., Delgado-Benarroch L., Roca M.J., Weiss J., Egea-Cortines M. 2012. Quantitative levels of *Deficiens* and *Globosa* during late petal development show a complex transcriptional network topology of B function. *Plant. J.* 72(2): 294-307.
- [7] Ruiz-Hernández V., Roca M.J., Egea-Cortines M., Weiss J. 2018. A comparison of semi-quantitative methods suitable for establishing volatile profiles. *Plant. Methods*. 14(1): 67.
- [8] Fenske M.P., Hazelton KDH., Hempton A.K., Shim J.S., Yamamoto B.M., Riffell J.A., Imaizumi T. 2015. Circadian clock gene *LATE ELONGATED HYPOCOTYL* directly regulates the timing of floral scent emission in *Petunia*. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. 112(31): 9775-9780.
- [9] Terry M.I., Pérez-Sanz F., Díaz-Galián M., Pérez de los Cobos F., Navarro P.J., Egea-Cortines M., Weiss, J. 2019. The *Petunia* CHANEL Gene is a ZEITLUPE Ortholog Coordinating Growth and Scent Profiles. *Cells*. 8(4): 343.

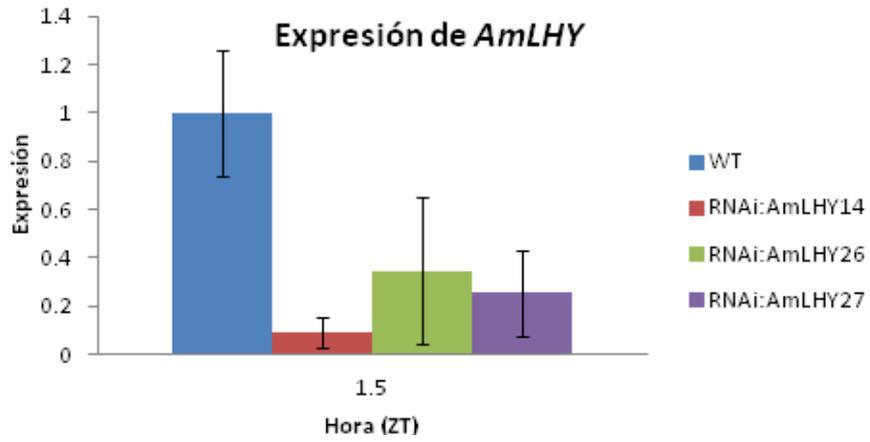


Figura 1. Expresión del gen *AmLHY* en plantas silvestres (WT) y líneas transgénicas (*RNAi:AmLHY14*, *RNAi:AmLHY26*, *RNAi:AmLHY27*).

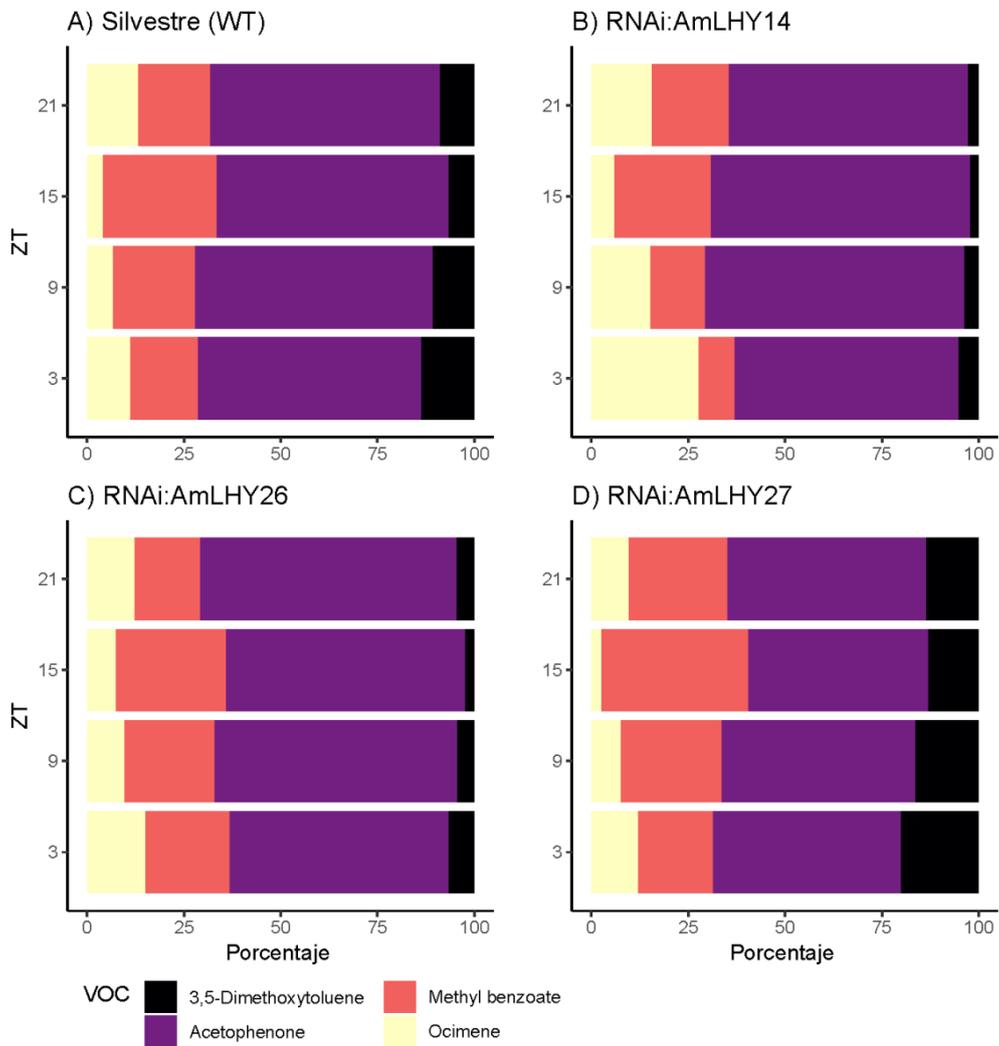


Figura 2. Perfil aromático a lo largo de 24 h en flores silvestres (A) y transgénicas de las líneas *RNAi:AmLHY14* (B), *RNAi:AmLHY26* (C), *RNAi:AmLHY27* (D).

PepGPFm2, PepDsRed and PepBar, a new generation of viral vectors based on pepino mosaic virus

PepGPFm2, PepDsRed and PepBar, una nueva generación de vectores virales basados en el virus del mosaico del pepino dulce

F. Ruiz-Ramón^{1,2*}, R.N. Sempere², F.E. Méndez-López¹, M.A. Sánchez-Pina¹, M.A. Aranda¹

¹Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), Departamento de Biología del Estrés y Patología Vegetal, PO Box 164, 30100 Espinardo, Murcia. Spain

²R+D+I Department, Abiopep S.L., Murcia. Spain

*fruib@abiopep.es

Abstract

Our group has already developed an efficient Pepino mosaic virus (PepMV; genus Potexvirus)-based vector (pBPepGFP2a) for protein expression and virus-induced gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. We have improved pJLPepGFP2a in terms of stability and suitability for reporting infections in *N. benthamiana* and tomato, producing pJLPepGFPm2 and pJLPepDsRed. These new vectors have been used for PepMV subcellular localization assays. Moreover, to be used in massive susceptibility screenings, we also developed PepBar, in which the *gfp* gene from PepGFPm2 was substituted by the bar gene, an herbicide resistance gene. This vector was stable for at least two passages both in *N. benthamiana* and tomato plants.

Keywords: GFP; dSRed; mCherry; BAR; tomato.

Resumen

Nuestro grupo ya ha desarrollado un vector eficiente (pBPepGFP2a) basado en el virus del mosaico de pepino dulce (PepMV; género Potexvirus) para la expresión de proteínas y el silenciamiento génico inducido por virus en *Nicotiana benthamiana*. Tras mejorar pJLPepGFP2a en términos de estabilidad e idoneidad para la monitorización de la infección tanto en *N. benthamiana* como en tomate, los vectores pJLPepGFPm2 y pJLPepDsRed han sido empleados para el estudio de localización subcelular de PepMV. A la vez hemos desarrollado un vector, PepBar, para su empleo en escrutinios masivos de susceptibilidad, en el que el gen *gfp* de PepGFPm2 fue sustituido por el gen *bar*, un gen de resistencia a herbicidas. Este vector fue estable durante al menos dos pasajes tanto en *N. benthamiana* como en plantas de tomate.

Palabras clave: GFP; dSRed; mCherry; BAR; tomate.

1. INTRODUCCIÓN

El virus del mosaico de Pepino dulce (PepMV) es un virus que causa unas importantes pérdidas económicas en cultivos de tomate a nivel mundial. PepMV pertenece al género Potexvirus (familia Flexiviridae). El genoma de PepMV está formado por una molécula de ARN

monocatenario de aproximadamente 6,4 kb de longitud, que comprende cinco marcos de lectura abiertos (ORF) flanqueados por regiones 5' y 3' UTR. Los ORF codifican una ARN polimerasa dependiente de ARN de 164 kDa (RdRp); tres proteínas de bloque de genes triples (TGB) llamadas TGBp1 (26 kDa), TGBp2 (14 kDa) y TGBp3 (9 kDa); y la proteína de cápsida de 25 kDa (CP) [1]. PepMV es un buen candidato como vector de expresión en plantas debido a su alto nivel de acumulación y la ausencia de síntomas de infección severa para algunos aislados, factores que ya han llevado al desarrollo de otros vectores de potexvirus [2]. Los virus de plantas son vectores de expresión útiles porque pueden provocar infecciones sistémicas que permiten que se produzcan rápidamente grandes cantidades de proteína recombinante en tejidos vegetales diferenciados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Construcciones de DNA y vectores de PepMV

Todos los mutantes y vectores de PepMV se construyeron mediante PCR solapantes y posteriormente se clonaron, pBPepBar en el vector pBIN61, mientras que pJLPepGFPm2 y pJL89PepDsRed se clonaron en el vector pJL89.

2.2 Agroinoculación y visualización de la fluorescencia e inoculación

Se transformó *Agrobacterium tumefaciens* (cepa C58C1) con las diferentes construcciones de PepMV mediante electroporación. El producto de la transformación se incubó 2 h a 28°C y posteriormente se plaqueó. Posteriormente se picó una colonia de cada placa y se pasó a 10 mL de cultivo líquido, que se incubó durante una noche a 28°C. A la mañana siguiente estos cultivos se centrifugaron a 2500 g durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió en el mismo volumen de 10 mM de MES (pH 5,5), 10 mM de MgSO₄ y 100 µM de acetosirina y se dejó incubando a 3 horas a 25°C. A continuación, se agroinfiltraron con jeringa las hojas de *N. benthamiana* con una mezcla del cultivo y supresor de silenciamiento p19 en una proporción 1:3. La inoculación mecánica en tomate y *N. benthamiana* se llevó a cabo homogeneizando el tejido de la hoja sistémica infectada en fosfato de sodio 30 mM, pH 8,0. Las plantas de *N. benthamiana* y tomate se cultivaron en una cámara de crecimiento (fotoperíodo de 16 h, 25°C). La fluorescencia se observó bajo luz UV (365 nm) proporcionada por una lámpara de mano (lámpara Blak Ray B100-AP, Upland, CA 91786, EE. UU.).

2.3 Extracciones de RNA y RT-PCR

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

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Empleo de los vectores marcados para un análisis de localización subcelular de PepMV

Los vectores pJLPepGFPm2 y pJL89PepDsRed fueron usados para un estudio de localización de PepMV en células de *N. Benthamiana* y tomate. Las plantas de *N. Benthamiana* fueron inoculadas con ambos vectores, obteniendo resultados similares, mientras que las plantas de tomate fueron inoculadas con pJL89PepDsRed. La emisión de la fluorescencia fue analizada con microscopio de laser confocal (MLC) en hoja agroinfiltrada. Tanto en *N. Benthamiana* como en tomate observamos unos cuerpos fluorescentes que estaban presentes en casi todas las células (Fig. 1a-d). Estos cuerpos parecían tener una localización citoplasmática, cercana al núcleo. (Fig. 1b, d). Para estudiar su posible relación con orgánulos como el retículo endoplásmico (RE) o el

aparato de Golgi (G) realizamos nuevos experimentos en *N. Benthamiana*, en los que co-agroinfiltramos pJLPepGFPm2 y un marcador de RE o G que portan la proteína fluorescente m-Cherry. En plantas co-agroinfiltradas con pJLPepGFPm2 y RE-mCherry, observamos una aparente reorganización de la fluorescencia emitida por ER-mCherry, localizándose en unos agregados similares a los que habíamos descritos anteriormente en infecciones simples con pJLPepGFPm2 o pJL89PepDsRed (Fig.1f-h). Tomando estas imágenes a mayor aumento, observamos como la fluorescencia verde del virus y la fluorescencia fucsia de RE-mCherry están asociadas pero no se solapan (Fig.1i-j). En análisis similares usando esta vez el marcador G-mCherry, obtenemos resultados similares (Fig.1l-o), en los que se observa una asociación entre la fluorescencia emitida por el virus (verde) y la emitida por el marcado G-mCherry (fucsia) pero las señales no llegan a solapar (Fig.1p-r). Estos resultados sugieren que, tanto el RE como el G parecen estar íntimamente relacionados con los cuerpos formados a consecuencia de la infección de PepMV, pero no parecen formar parte de ellos.

3.2 Vector PepBar como herramienta de selección en escrutinios masivos en tomate

Mientras que PepDsRed parece ser un vector suficientemente eficiente para tomate, consideramos que un vector que expresa el gen *bar* de resistencia a herbicidas podría completar el conjunto de herramientas basadas en PepMV, particularmente para su uso como herramienta de selección en escrutinios masivos de susceptibilidad. La construcción pBPepBar está nuevamente basada en la estructura de PepGFPm2, siendo el gen *gfp* sustituido por el gen *bar* (Fig. 2a). Este vector fue empleado para inocular plantas de *N. Benthamiana* a la vez que se inocularon plantas con el virus silvestre. A los 15dpi, todas las plantas fueron tratadas con glufosinato de amonio al 0,05%. Una semana después del tratamiento las plantas inoculadas con el virus silvestre mostraban síntomas de marchitamiento severo, mientras que las inoculadas con PepBar se mostraban totalmente sanas (Fig. 2b). A las dos semanas post-tratamiento las plantas control estaban totalmente muertas mientras que las inoculadas con PepBar lucían sanas y vigorosas. Posteriormente se empleó extracto de hoja sistémica de *N. Benthamiana* inoculada con PepBar para inocular mecánicamente plantas de tomate. A los 15 dpi se trataron, las plantas inoculadas con PepBar y plantas de tomate inoculadas con el virus silvestre, con glufosinato de amonio al 0,05%. A las dos semanas del tratamiento con el herbicida, las plantas inoculadas con el virus silvestre estaban marchitas mientras que las plantas inoculadas con PepBar seguían completamente sanas (Fig. 2c). El ensayo de estabilidad realizado a lo largo de una serie de pases, muestra la estabilidad del vector al menos durante tres pases, aunque en este último se observó ya una cierta inestabilidad del mismo (Fig. 2d).

4. CONCLUSIONES

En resumen, el vector PepDsRed es capaz de mejorar los niveles de expresión y la estabilidad en *N. Benthamiana* y especialmente en tomate, especie en la cual se han descrito por primera vez los cuerpos multivesiculares resultantes de la infección de PepMV, lo que abre una nueva vía de investigación centrada en la interacción molecular entre el huésped/potexvirus.

5. AGRADECIMIENTOS

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

6. REFERENCIAS

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

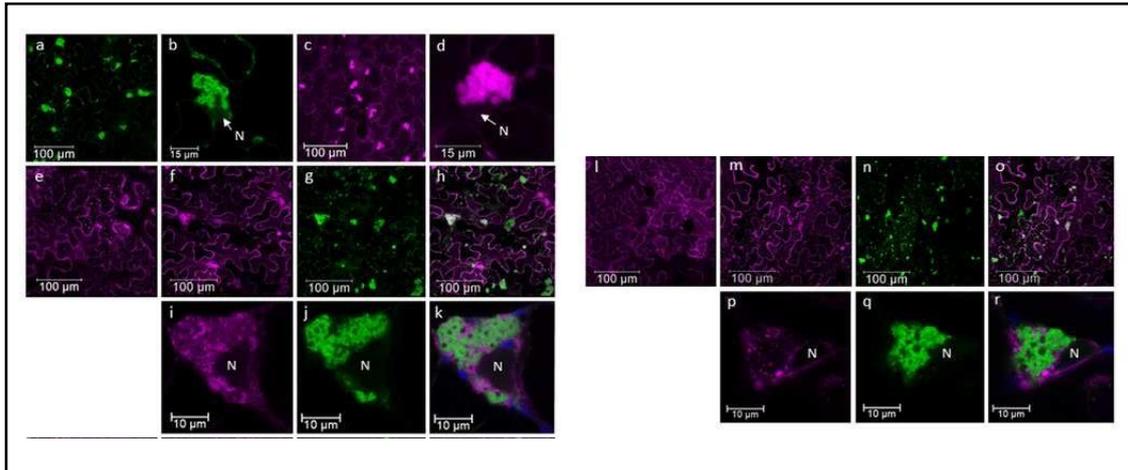


Figura 1. Cuerpos subcelulares inducidos por PepMV en *N. Benthamiana* y planta de tomate (a-b) Imagen de MLC de la infección con pJLPepGFPm2 en *N. Benthamiana* (c-d) y pJL89PepDsRed en tomate. (e) Distribución del marcador RE-mCherry, (f-h) Re-distribución del marcador RE-mCherry en presencia de pJLPepGFPm2. (i) Magnificación de la distribución de RE-mCherry en presencia de (j) pJLPepGFPm2 e (k) imágenes solapadas. (l) Distribución del marcador G-mCherry, (m-o) Re-distribución del marcador G-mCherry en presencia de pJLPepGFPm2. (p) Magnificación de la distribución de G-mCherry en presencia de (q) pJLPepGFPm2 e (r) imágenes solapadas. N, núcleo.

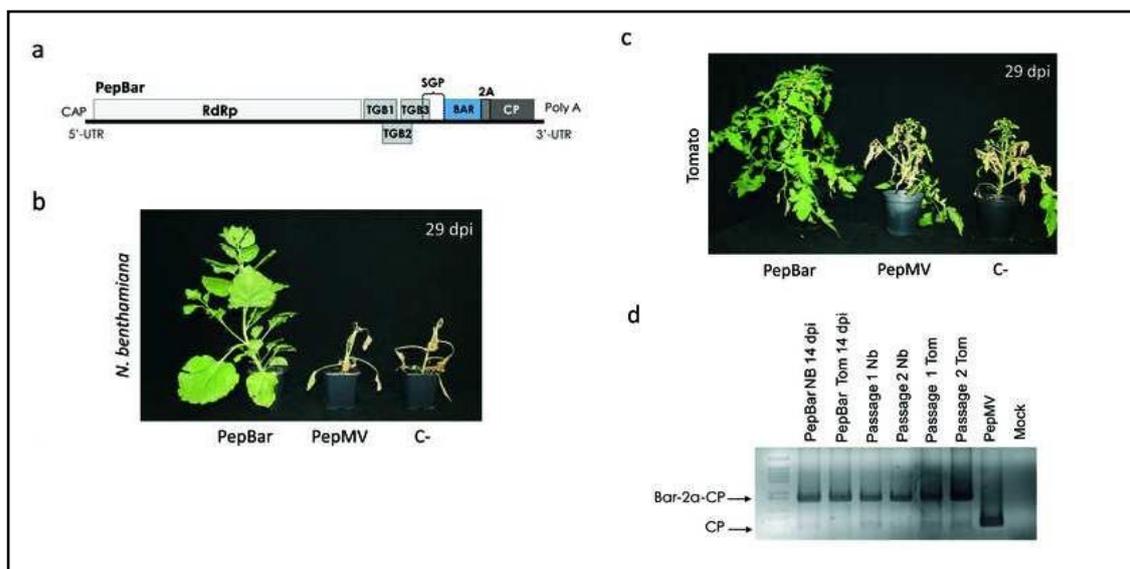


Figura 2. *N. Benthamiana* y planta de tomate infectadas con PepBar. (a) Representación esquemática de PepBar (b) y (c) *N. Benthamiana* y planta de tomate inoculadas con PepBar y Pep-SP13(silvestres). (d) RT-PCR para analizar la estabilidad del inserto.

A lighting system to increase the early flowering in *Fragaria x ananassa*

Un sistema de iluminación para aumentar la floración precoz en *Fragaria x ananassa*

M.V. Díaz-Galián^{1*}, P.J. Navarro Lorente², M. Egea-Cortines¹

¹Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena. Spain

²Departamento de Tecnología de la Información y Telecomunicaciones, Universidad Politécnica de Cartagena. Spain

*mariavictoria.diaz@edu.upct.es

Abstract

The integration of environmental signals to biological systems occurs in many cases via the circadian. We have modified it using commercial strawberry (*Fragaria x ananassa*) with several lighting conditions. We obtained an increase up to 270% in the number of early flowers with a specific light treatment in comparison with non-artificial lighting control. The treatments do not affect the fruit size. The results indicate the importance of different wavelengths in order to improve the early productions of Strawberry.

Keywords: flower; photoperiod; strawberry.

Resumen

La integración de señales ambientales a los sistemas biológicos ocurre en muchos casos a través del reloj circadiano. Hemos llevado a cabo una manipulación del mismo en fresa comercial (*Fragaria x ananassa*) con condiciones de iluminación divergentes. En comparación con el control sin iluminado hemos obtenido aumentos de hasta un 270% de aumento de floración temprana en uno de los tratamientos luminosos. Los tratamientos no afectaron de forma significativa al tamaño del fruto. Los resultados indican el potencial de las diferentes longitudes de onda para mejorar las producciones tempranas de fresa.

Palabras clave: flor; fotoperiodo; fresa.

1. INTRODUCCIÓN

La fresa es un cultivo de alto valor añadido debido a la calidad organoléptica de sus frutos. En inicio de temporada, puede llegar a más de 12 €/kg de precio al consumidor. La fresa (*Fragaria x ananassa*) es una planta de la familia de las *Rosaceae* con unos requerimientos de frío y luz para florecer [1].

El reloj circadiano está formado por una serie de genes que integran señales internas y externas, tales como luz y temperatura. Consecuentemente, la modificación de alguna de estas señales modifica el comportamiento de la planta. Centrándonos en este trabajo, se puede modificar la señal luminosa y de esta forma, alterar la señal de floración [2].

Por ello al modificar las condiciones externas se puede llegar a conseguir una floración mayor o más temprana. Además, puede afectar al crecimiento vegetativo. Además, en estudios previos se demostró que el aumento excesivo en el fotoperiodo producía una disminución de la

floración en *Fragaria ananassa* [3,4,5,6]. También se ha visto una diferencia en la calidad del fruto de la fresa según el número de horas de luz [6].

Por lo tanto, hemos estudiado el efecto que tendría sobre la floración el uso de unas determinadas luminarias durante 3 meses, analizando además el tamaño del fruto obtenido.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para conseguir los objetivos propuestos se requirió de material vegetal, herramientas bioinformáticas y de los sistemas de visión e iluminación:

2.1 Material vegetal

Se trabajó con fresa comercial, *Fragaria x ananassa* cv Fortuna, obtenidas gracias a una empresa local. Se llevó a cabo un estudio en invernadero, comprendido entre los meses de diciembre y marzo, en 3 tratamientos diferentes (control, tratamiento A con luminarias y tratamiento B con luminarias). Se realizó un estudio en invernaderos comerciales (datos no presentados).

2.2 Herramientas bioinformáticas

Se utilizaron dos lenguajes informáticos: R y Matlab para el análisis estadístico.

2.3 Sistemas de iluminación

Se hizo uso de luminarias diseñadas específicamente para este estudio basadas en LED y bajo propiedad intelectual de la empresa que los diseñó.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En cuanto al trabajo desarrollado en el invernadero, se han observado un aumento del máximo de 270% (Tabla 1) en el número de flores entre uno de los tratamientos con luminarias y el control. Además, durante todo el estudio, que comprendía 3 meses, el número de flores en los tratamientos con iluminación artificial era más elevado (Fig. 1). Entre los tratamientos con iluminación también se han encontrado diferencias entre estas, con un punto máximo al inicio en torno al 120%, del tratamiento A frente al B. Esto verifica lo demostrado en estudios anteriores, puesto que un fotoperiodo ligeramente más largo de 12/12h (día/noche) aumentaba de forma general el número de flores [3-6]. Además, se han observado diferencias estadísticas al inicio del proceso de floración incluso entre los tratamientos, lo que demostraría que no solo influye la longitud de las horas de luz al día, sino también las longitudes de onda que se le apliquen al material vegetal.

Sin embargo, aunque haya tratamientos cuyas plantas produzcan un número mayor de frutos, no se observan diferencias en la evolución de las dimensiones (largo y ancho) del fruto (Fig. 2 y 3), lo cual contrasta con los resultados obtenidos en un estudio previo donde se comprobaba una ligera diferencia de tamaños [6].

4. CONCLUSIONES

El tratamiento A y B ha mostrado una mayor floración, lo que sería de gran utilidad para su puesta en acción en plantaciones de producción, con el fin de tener un fruto precoz y de mejor calidad.

En cuanto al tamaño del fruto no se observan diferencias entre los tratamientos, por lo que indicaría que el cambio en el fotoperiodo no mejoraría el desarrollo del fruto.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto CDTI-5717/17CTA-P.

6. REFERENCIAS

- [1] Konsin M., Voipio I., and Palonen P. 2001. Influence of photoperiod and duration of short-day treatment on vegetative growth and flowering of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). The J.Hort. Sci. Biotech 76:77–82.
- [2] Navarro P.J., Fernández C., Weiss J., and Egea-Cortines M. 2012. Development of a Configurable Growth Chamber with a Computer Vision System to Study Circadian Rhythm in Plants. Sensors 12:15356–15375.
- [3] Balasubramanian S., Sureshkumar S., Lempe J., and Weigel D. 2006. Potent Induction of Arabidopsis thaliana Flowering by Elevated Growth Temperature. PLOS Genetics 2: e106.
- [4] Heide O.M. 1977. Photoperiod and Temperature Interactions in Growth and Flowering of Strawberry. Physiol. Plant 40: 21–26.
- [5] Mière P.L., Hadley P., Darby J., and Battey N.H. 1996. The effect of temperature and photoperiod on the rate of flower initiation and the onset of dormancy in the strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). J. Hort. Sci. 71: 361–371.
- [6] Hidaka K., Dan K., Imamura H., Miyoshi Y., Takayama T., Sameshima K., Kitano M., and Okimura M. 2013. Effect of Supplemental Lighting from Different Light Sources on Growth and Yield of Strawberry. Environ. Control Biol. 51: 41–47.

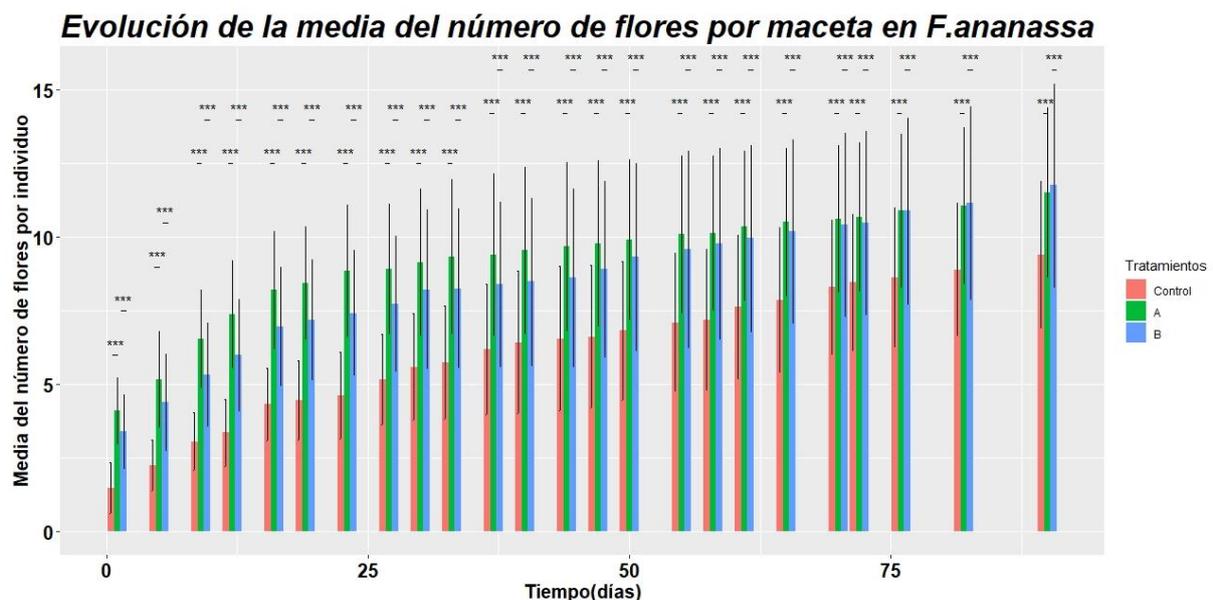


Figura 1. Evolución de la media del número de flores por maceta en *F. ananassa*. *** corresponde a un p -value $\leq 0,001$ usando el test estadístico adecuado.

Tabla 1. Porcentaje del número de flores de fresa frente al control en los tres primeros periodos en los que se cogieron datos.

Tratamiento/ Periodo	A (%)	B (%)
1	274	227
5	228	194
9	214	174

Evolución de la anchura de las fresas por individuo

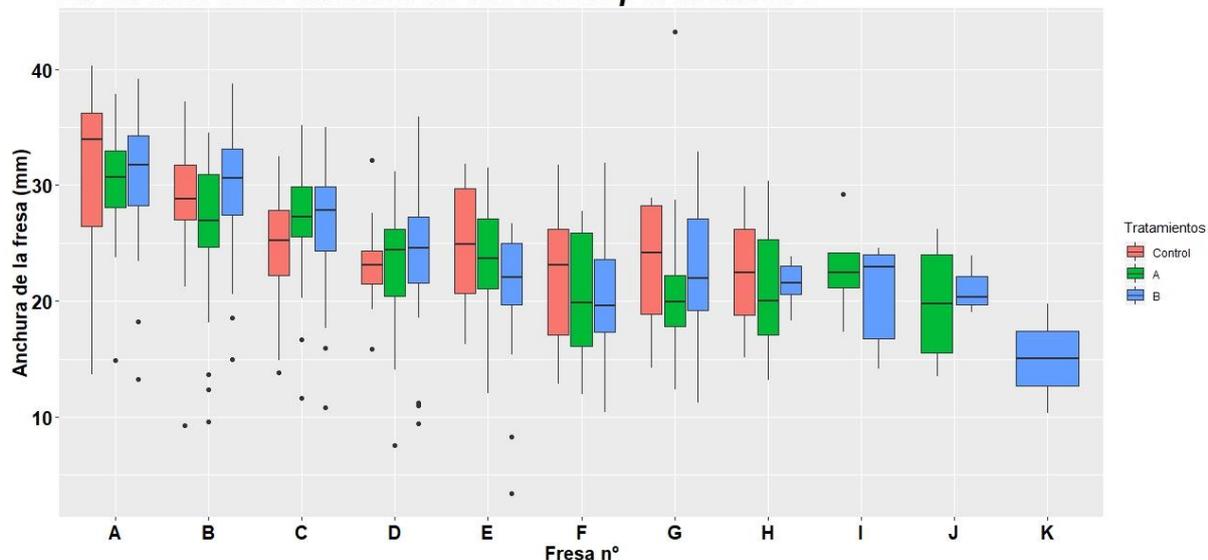


Figura 2. Evolución de la anchura de las fresas por tratamiento.

Evolución de la longitud de las fresas por individuo

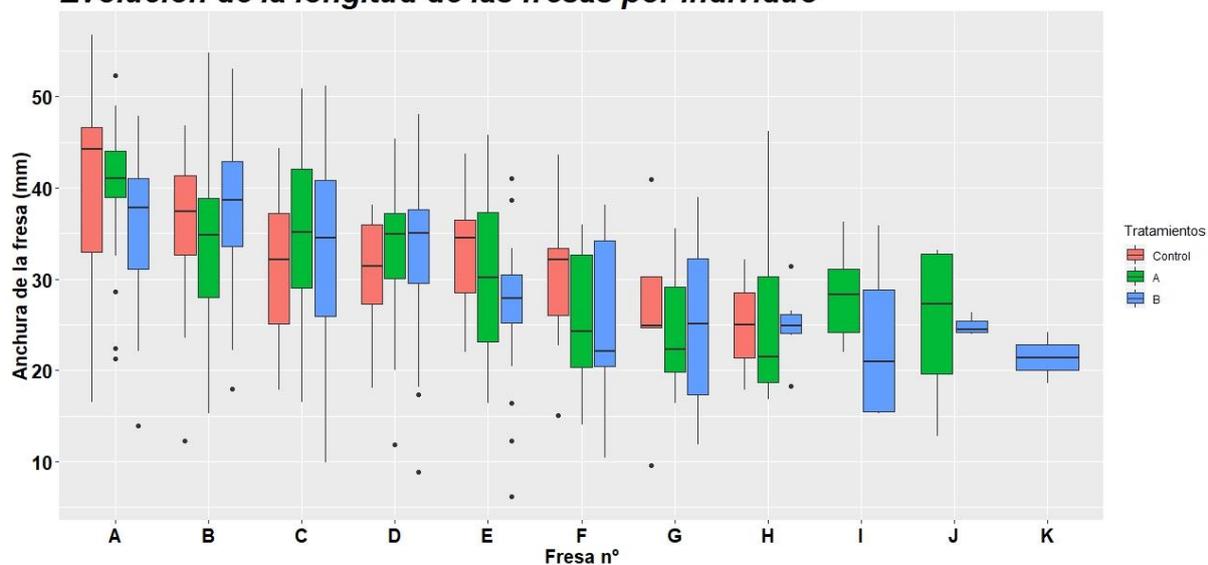


Figura 3. Evolución de la longitud de las fresas por tratamiento.

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

Desarrollo de alelos de pérdida de función basados en CRISPR/CAS9 para estudio de desarrollo de flor y fruto

S. Arbatli*, J. Weiss, M. Egea-Cortines

Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena

*arbatlis@gmail.com

Abstract

The CRISPR/cas9 system has taken over the methodologies to obtain new alleles as it is based on DNA repair mechanisms activated locally by DNA breakage. The CRISPR/Cas9 complex is driven by a guide RNA conferring specificity of action on a given DNA sequence. The aim of the work is to develop a set of alleles in genes of interest involved in flower and fruit development.

Keywords: genetic engineering; developmental genetics.

Resumen

El sistema CRISPR/Cas9 se ha convertido en la tecnología más útil para obtener alelos nuevos al estar basada en el proceso local de reparación de ADN activado localmente por la rotura del ADN. El complejo CRISPR/Cas9 es guiado por una molécula guía de ARN que le da especificidad de acción sobre una secuencia de ADN concreta. El objetivo del trabajo es desarrollar una colección de alelos en genes de interés relacionados con el desarrollo de la flor y fruto

Palabras clave: ingeniería genética; genética del desarrollo.

1. INTRODUCTION

To date, there are different types of gene editing strategies developed such as, meganucleases, Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs), Zinc Finger Nucleases (ZFNs) and the CRISPR-Cas9 system. [1, 2]. Unfortunately, TALENs and ZFNs systems are mainly based on protein-DNA interactions which requires cloning of new protein for each target site [3]. In contrast, CRISPR/Cas systems function via an RNA based recognition complex. Thus, by simply altering the guide RNA, Cas9 system can aim towards a new target location. Therefore, this feature makes CRISPR/Cas9 system a crucial element of gene editing strategies.

It has been shown that the CRISPR/Cas9 technology has been successfully used in Petunia and tomato [4-6]. The aim of the PhD proposal is to develop a set of CRISPR/Cas9 based alleles in genes of interest for flower and fruit development. Antirrhinum, petunia, tomato and Arabidopsis plants will be studied.

In this study, we aim to investigate the effects of an interruption with CRISPR/Cas9 precise gene editing technology in the genes naming ETS-related transcription factor (ELF4), Enhancer of benzenoid II (EOBII) and Zeitelupe (ZTL) in order to identify their roles in development and scent

production. Accordingly, both *Anthirrinum majus* (*A. majus*) and *Petunia hybrida* (*P. hybrida*) plants have been selected for the experimental setup.

Therefore, regions related to the mentioned genes have been investigated and the most efficient gRNA for each individual region has been selected in order to design CRISPR/Cas9 based alleles.

2. MATERIALS and METHODS

A. majus hypocotyl transformation and *P. hybrida* leaf transformation protocols have been described below.

2.1 Gene Database development

The flowering and fruit development related genes of *A. majus* and *P. hybrida* species have been selected and obtained from previous studies of our laboratories and online databases.

2.2 Plant Material

The *P. hybrida* and *A. majus*, will be grown in growth chamber conditions and the full development will be held in greenhouse followed by transformation of CRISPR/Cas9 technique. Seeds of *P. hybrida* line Mitchell and *A. majus* will be surface-sterilized. The seeds will be sowed on Murashige and Skoog medium (Duchefa, Haarlem, Netherlands) and will be solidified with 4 g/L of Phytigel (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). The samples will be placed on growth chambers under a photoperiod of 16/8 h of light/dark and 25°C/18°C temperature.

2.3 Vector Construction

The vector constructions have been obtained from a private company for both *A. majus* and *P. hybrida* separately according to their individual protocol.

2.4 *A. majus* Hypocotyl Transformation (Agrobacterium)

Transformation will be conducted by using *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105, through PBinPlus agrobacterium vector including the gene of interest (ELF4, EOBII and ZTL) for *A. majus*. Seeds have been put in to the growth chamber (8 h dark 18°C / 16 h light 25°C) on MS plates. Seeds will be grown 2 weeks followed by hypocotyl collection and transformation via EHA105. The hypocotyls have been put in new MS contained petri dishes. Plates will be incubated in dark for a week and slowly adapted to the light conditions of growth chamber by removing a sheet layer each day from the top of petri dishes. Hypocotyls have been inserted in to the growth chamber with new MS plates. Plants will be grown until callus formation following verification of gene editing process.

2.5 *P. hybrida* Leaf Transformation (Agrobacterium)

Transformation will be conducted by using *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 through PBinPlus agrobacterium vector including the gene of interest (ELF4, EOBII and ZTL) for *P. hybrida*. Seeds have been put in to the growth chamber (8 h dark 18°C / 16 h light 25°C) on MS poured containers in vitro. Plants will be grown until a certain point that is identified by early experiments for the leaf collection process. The leaves will be incubated with LBA4404 agrobacterium strain in order to integrate the selected plasmid into the plant genome.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The correlation between the genes of interests and the developmental stages, especially circadian clock related pathways, of selected plants are aimed to be observed.

A. majus plants have been transformed with Cas9 vector in order to produce Cas protein required for CRISPR/Cas9 system to function. *P. hybrida* plants also have been planted for further leaf collection followed by leaf transformation with *Agrobacterium tumefaciens*.

4. CONCLUSIONS

The simplicity and sustainability of CRISPR/Cas9 system makes it a valuable genome editing tool amongst other genome editing methods. The gene editing techniques having the ability to accelerate plant breeding by enabling the precise gene modifications. CRISPR/Cas9 technology is specifically important amongst all other gene editing technologies due to its ability to modify multiple traits simultaneously [7]. Moreover, the technique does not require any protein engineering processes.

In this Phd thesis, we aim to obtain CRISPR/Cas9 based alleles targeting the ELF4, EOBII and ZTL on both *A. majus* and *P. hybrida* plant genomes in order to investigate their response in the manners of developmental genetics.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The experiments will be conducted in Institute of Plant Biotechnology (IBB), Cartagena within Polytechnic University of Cartagena. This work is supported by BFU2017-88300-C2-1-R.

6. REFERENCES

- [1] Li T., Huang S., Jiang W.Z., Wright D., Spalding M.H., Weeks D.P., Yang B. 2011. TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Res* 39: 359–372.
- [2] Mahfouz M.M., Li L., Shamimuzzaman Md., Wibowo A., Fang X., Zhu J.-K. 2011. De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 2623–2628.
- [3] Feng Z., Zhang B., Ding W., Liu X., Yang D.-L. Wei P., Cao F., Zhu S., Zhang F., Mao Y. Zhu, J.-K., 2013. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res* 23: 1229–1232.
- [4] Manchado-Rojo M., Weiss J., Egea-Cortines M., 2014. Validation of Aintegumenta as a gene to modify floral size in ornamental plants. *Plant Biotechnology Journal* 12: 1053–1065.
- [5] Zhang B., Yang X., Yang C., Li M., Guo Y. 2016. Exploiting the CRISPR/Cas9 System for Targeted Genome Mutagenesis in *Petunia*. *Sci Rep* 6.
- [6] Jacobs T.B., Zhang N., Patel D., Martin G.B. 2017. Generation of a Collection of Mutant Tomato Lines Using Pooled CRISPR Libraries. *Plant Physiology* 174: 2023–2037.
- [7] Bortesi L., Fischer R. 2015. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances* 33: 41–52.

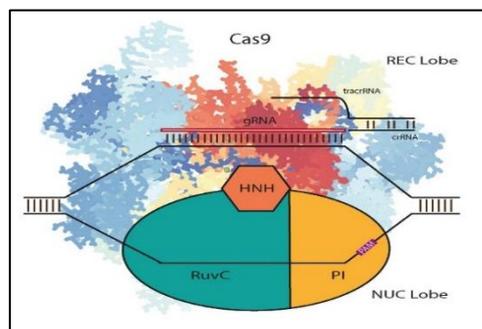


Figure 1. The representative image of RNA guided DNA cleavage by CRISPR/Cas9 system.

ELF4 <i>Petunia axiliaris</i>					
Name	Score	Sequence	Strand	Position	GC
>Paxil_ELF4 Peaxi162Scf00825g00024.1	0.3467	GTTGTTGCTCTCATCTCAATGG	-	406	45 %
>PhELF4silenced Peaxi162Scf00825g00233.1	0.4402	AGATCACGACTTCAGTATGGAGG	+	265	45 %
>Paxil_ELF4_ Peaxi162Scf00825g00022.1	0.7515	TGTCGTGTGATCTTGACTGATGG	-	149	50 %
ELF4 <i>A. majus</i>					
Name	Score	Sequence	Strand	Position	GC
>ELF4_Amajus_347b_scaffold	0.6121	GGAGTAAAGCGACACCACTTTGG	-	264	50 %
EOBII <i>Petunia axiliaris</i>					
Name	Score	Sequence	Strand	Position	GC
Peaxi162Scf00080g00064	0.5414	TTATGGCTCGGACGTA CTGAGG	+	803	50 %
EOBII <i>A. majus</i> gRNA sequences					
Name	Score	Sequence	Strand	Position	GC
>Chr3 Chr3:34135221..34136156 (+ strand) class=gene length=936	0.4245	GGAAGAGTTGCAGATTACGGTGG	+	374	50 %
>Chr5 Chr5:56923523..56924575 (+ strand) class=gene length=1053	0.3571	AGTTTGGT GAGTAGTGACGGTGG	+	863	50 %
ZTL <i>Petunia axiliaris</i>					
Name	Score	Sequence	Strand	Position	GC
>PaxilZTL cl Peaxi162Scf01124g00126.1	0.6138	GGATTGAGATACCAGTGACGTGG	+	1353	50 %
ZTL <i>A. majus</i>					
Name	Score	Sequence	Strand	Position	GC
S20- 2_N413_trimmed_contig_7 988 ADO1_ARATHRecName	0.5889	CTTCTGTTGGTTCTGTTGTCGG	-	1764	50 %
>S20- 2_N413_trimmed_contig_7 067 ADO1_ARATHRecName	0.7652	CGTCGATCGTTATCCGTGATGG	-	2286	50 %

Figure 2. List, sequence and GC contents of designed gRNA constructs related to the ELF4, ZTL, EOBII genes according to their species.

Impact of different crop rotation sequences and management practices on soil bacterial diversity in Northern Netherlands

Impacto de diferentes secuencias de rotación de cultivo y prácticas de manejo en la diversidad bacteriana edáfica en Holanda Septentrional

O. Özbolat^{1*}, J. Cuartero², M. Egea¹, M. Ros², J.A. Pascual², R. Zornoza¹

¹Instituto de Biotecnología Vegetal (IBV), Campus Muralla del Mar, Edificio I+D+I, Universidad Politécnica de Cartagena, 30202, Cartagena. Spain

²CEBAS-CSIC, Campus Universitario Street, 3A, 30100, Murcia. Spain

*onurcan.ozbolat@edu.upct.com

Abstract

Identification of soil bacterial community structure and diversity provides a huge insight into soil quality due to the intense biochemical relationships between soil microbiome and interacting plants. The aim of this study was to assess how different diversified cropping systems under two different management (conventional and biodynamic) can affect soil bacterial diversity. Soil bacterial community was identified through next-generation sequencing of 16S rRNA coding genes of soil bacteria. The findings showed that different sequences of crop rotations, period of implementation of rotations and management practice had a strong influence on soil microbial biomass, bacterial biodiversity and the abundance of different bacterial phyla, without a specific trend regulated by these factors.

Keywords: soil microbiome; bacterial community; 16S rRNA; next-generation sequencing; rotations.

Resumen

La identificación de la estructura y diversidad bacteriana edáfica proporciona una visión enorme de la calidad del suelo debido a las intensas relaciones bioquímicas entre el microbioma del suelo y las plantas que interactúan. El objetivo de este estudio fue evaluar cómo diferentes sistemas de cultivo diversificados bajo dos diferentes tipos de manejo (convencional y biodinámico) afectan a la diversidad bacteriana del suelo. La comunidad bacteriana del suelo se identificó a través de la secuenciación de próxima generación de genes de codificación del RNAr 16S bacteriano. Los resultados mostraron que diferentes secuencias de rotaciones de cultivos, el periodo de implementación de las rotaciones y la práctica de manejo tienen una fuerte influencia en la biomasa microbiana, la biodiversidad bacteriana y la abundancia de diferentes filos bacterianos.

Palabras clave: microbioma del suelo; comunidad bacteriana; RNAr16S; secuenciación de próxima generación; rotaciones.

1. INTRODUCTION

Soil microorganisms, especially bacteria, play a non-replaceable role in soil processes contributing to the nutrient cycling, degradation and decomposition of organic and inorganic matter [1], contributing to soil fertility and the regulation of biogeochemical cycles. Moreover, the amount of soil microbial biomass plays a major role in driving the balance between the release of soil carbon (respiration) and its sequestration in soil organic matter along with the cycle of free nitrogen ions in agricultural ecosystems.

Even though monocropping is the agricultural trend of the past decades, it brings several environmental and ecological issues such as decline of soil fertility and biodiversity loss [2]. Crop rotations for a given agricultural field is the simplest and yet very strong practice to keep soil healthy in many ways including the bacterial biodiversity [3]. Soil microbes, which are considered as a second genome of plants, play fundamental roles in plant growth and health [4]. It is also proven that the biodiversity in soil bacterial population is strongly related and can be manipulated by changing the above-ground biodiversity [4]. Thus, the aim of this research was to assess how different rotation sequences performed under two different management practices (conventional and organic) can influence soil bacterial diversity.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Experimental setup

This study was performed in collaboration with different private farms in the cities Leeuwarden and Groningen, Northern Netherlands. We focused on six different farms with different diversified cropping systems based on different rotations, grown under two different managements, conventional and biodynamic, for ≥ 10 years. The diversified cropping systems (DCS) studied are:

DCS 1. Biodynamic: wheat-peas-grass-maize-grass rotation (rotation with addition of fertilizer)

DCS 2. Conventional: grass-maize-grass rotation

DCS 3. Biodynamic: grass clover-cauliflower-oat-potato-phacelia rotation (10 years system)

DCS 4. Biodynamic: grass clover-cauliflower-oat-potato-phacelia rotation (20 years system)

DCS 5. Conventional: potatoes-winter wheat-winter barley (rotation with addition of mycorrhiza and fertilizer)

DCS 6. Conventional: potatoes-winter wheat-winter barley (rotation with no addition of mycorrhiza)

2.2 Soil sampling and analyses

Soil was sampled after harvest in summer 2018 at 0-10 cm depth. Five random samples were taken per diversified cropping system. The samples were taken into ice with sterile bags in the field and carried to the laboratory, sieved <2 mm and kept at -20°C until analyses. DNA extraction from the soil samples was carried out by using DNeasy PowerSoil Kit, QIAGEN. Assignments of purity and concentration values were done by using NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer and by using Qubit® 2.0 Fluorometer and corresponding high sensitivity assay kit, Qubit dsDNA HS Assay Kit, respectively. Amplification of 16S hypervariable regions was carried out by using, Ion 16S™ Metagenomics Kit, ThermoFisher Scientific. Agilent 2100 Bioanalyzer® instrument used to evaluate concentrations and purity with the suitable Agilent High Sensitivity DNA Kit. Library preparation process was carried out by using Ion Xpress™ Plus gDNA Fragment Library Preparation Kit, ThermoFisher Scientific. Sequencing adaptors were used by Ion Xpress™ Barcode Adapters kit, ThermoFisher Scientific. Prepared library amplicons were

processed for template preparation by using Ion Sphere™ Particles (ISPs) to create template-positive ISPs via Ion OneTouch™ 2 System with suitable Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 Kit, ThermoFisher followed by the enrichment process using Ion OneTouch™ ES. Sequencing was carried out by Ion PGM™ System, Ion PGM™ Torrent Server and suitable Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing kit in competence with sequencing chips, Ion 314™ Chip v2 kit.

Raw sequencing results were processed through bioinformatics analyses to identify bacterial groups and families present in each sample. The process consisted of creating Operational Taxonomic Unit (OTU) tables by using the software QIIME™. Overall results were obtained by comparing the OTU tables against SILVA™ online database via QIIME.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Microbial biomass, estimated by DNA content in soil, was 5059 ng g⁻¹, 26409 ng g⁻¹, 6600 ng g⁻¹, 5258 ng g⁻¹, 3111 ng g⁻¹ and 2764 ng g⁻¹ for DCS 1, 2, 3, 4, 5 and 6, respectively. Soil bacterial biodiversity (chao index) is shown in Figure 1. CS3 showed significantly highest biodiversity, followed by CS2 > CS1 > CS4 = CS6. DCS5 is not included in the figure 1 due to the low number of reads for the data set (samples are to be repeated). These results highlight that soil bacterial biomass and diversity in arable crops under Atlantic climate in the Netherlands is not related to management system. It is normally observed that conventional management has lower soil biodiversity than organic practices such as biodynamic due to the use of high amount of pesticides [5]. CS3 and CS4 have the same rotation sequence, but CS4 has been performed for longer. However, the longest cultivation (20 years) seemed to negatively affect bacterial diversity compared to 10 years of cultivation. Moreover, long rotation sequences were not related either with higher biomass and biodiversity, since CS2 with only grass-maize rotation contributed to higher biodiversity. Different types of fertilizers used can differently affect bacterial diversity. It has been usually reported that mineral fertilizers have long-term detrimental effects on soil biodiversity [6]. However, this study of farms managed for more than 10 years under the same system, showed that conventional management with mineral fertilizers is not always related to negative impacts on microbial biomass or bacterial diversity, contrary to previous findings.

Figure 2 shows the identified phyla in the studied DCS and their abundance. It is observed that Actinobacteria, Acidobacteria and Proteobacteria phyla tended to significantly vary among DCS. Bacterial phyla Saccharibacteria, Chloroflexi and Acidobacteria were significantly lower in abundance in the longer (20 years) rotation fields (DCS4) in comparison to 10 years rotation fields (DSC3). On the other hand, Actinobacteria, Chlamydiae and Firmicutes seem to be increased in with the longer rotation history. The addition of mycorrhiza tended to decrease the proportion of Actinobacteria and Bacteroidetes, while significantly increased the abundance of Acidobacteria, Chloroflexi and Proteobacteria.

4. CONCLUSIONS

Microbial biomass and bacterial biodiversity and structure significantly changed with different rotations and management practices, with no direct relationship with rotation history or management practice. Longer sequences, longer periods of rotations or biodynamic manager was not related with higher biodiversity, as initially expected. Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi and Chlamydiae were the bacterial phyla most sensitive to changes in diversified cropping systems.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the European Commission Horizon 2020 project Diverfarming [grant agreement 728003].

6. REFERENCES

- [1] Wagg C, Bender SF, Widmer F, van der Heijden MGA. 2014. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *Proc Natl Acad Sci.* 111(14):5266–70
- [2] Brooker RW, Bennett AE, Cong WF, Daniell TJ, George TS, Hallett PD, et al. 2015. Improving intercropping: A synthesis of research in agronomy, plant physiology and ecology. *New Phytologist.* 04-2015:44
- [3] Tiemann LK, Grandy AS, Atkinson EE, Marin-Spiotta E, Mcdaniel MD. 2015. Crop rotational diversity enhances belowground communities and functions in an agroecosystem. *Ecol Lett.* 215(11):06-15
- [4] Berendsen RL, Pieterse CMJ, Bakker PAHM. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.* 17(8):478–86
- [5] Hartmann M, Frey B, Mayer J, Mäder P, Widmer F. 2015. Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. *ISME J.* 9(5):1177–94
- [6] de Graaff MA, Hornslein N, Throop HL, Kardol P, van Diepen LTA. 2019. Effects of agricultural intensification on soil biodiversity and implications for ecosystem functioning: A meta-analysis, 1st ed, de Graaff MA, Hornslein N, eds. (*Advances in Agronomy.* Elsevier Inc., NL). pp.1–44

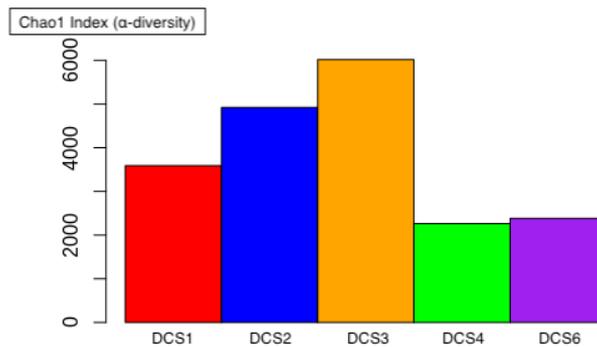


Figure 1. The α -diversity (Chao index) of the bacterial communities in different diversified cropping systems.

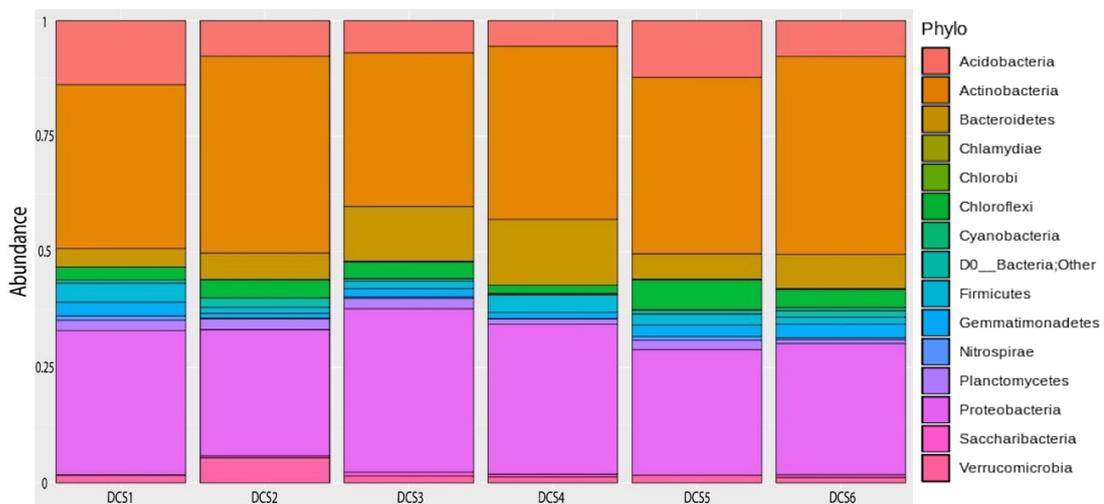


Figure 2. The relative abundance of bacteria at the phylum level across all soil samples. Each column represents a data set explained as in methods section (bacterial phylum abundance <1% was ignored).

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

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

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

Instituto de Biotecnología Vegetal (IBV), Campus Muralla del Mar, Edificio I+D+I, Universidad Politécnica de Cartagena, 30202, Cartagena. Spain

*raquelalcantudrodriguez@gmail.com

Abstract

***Antirrhinum majus* has been used as a model plant in genetics since the beginning of the 20 Century. Species of *Antirrhinum* have also been used in studies of natural variation. In the present study we used *A. majus* line 165E in order to study the effect of various temperature regimes over the vegetative and generative development with special emphasis on pollen viability and volatile profile. These two parameters are of special importance for pollination.**

Keywords: flower; pollen; segregation; temperature; volatiles.

Resumen

***Antirrhinum majus* se ha utilizado como planta modelo en genética desde el principio del siglo XX. Varias especies de *Antirrhinum* se han utilizado también en estudios de variación natural. En el presente ensayo hemos utilizado *A. majus* línea 165E para estudiar el efecto de diferentes combinaciones de temperaturas sobre caracteres vegetativos y generativos con especial énfasis en la viabilidad del polen y el perfil de volátiles. Estos dos parámetros son de especial importancia para la polinización.**

Palabras clave: flor; polen; segregación; temperatura; volátiles.

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día junto con *Arabidopsis thaliana*, *Antirrhinum* es uno de los modelos más utilizados para estudios de los genes involucrados en el desarrollo de las plantas; además de ser una especie de interés ornamental, *Antirrhinum* también es objeto de estudio en desarrollo floral o en la síntesis y emisión de volátiles [1]; estos últimos están cobrando una especial importancia ya que parece estar negativamente influido por el incremento de la temperatura [2]. En la actualidad los protocolos de transformación y análisis fenotípicos están desarrollados en su totalidad [3].

En el presente trabajo, aplicando estos protocolos y utilizando *Antirrhinum majus* (línea 165E), se ha estudiado el efecto de la temperatura en la viabilidad del polen, el tamaño de las flores y la concentración de antocianinas en pétalos. Nuestro objetivo es comprender mejor el efecto medioambiental sobre el desarrollo generativo en el género *Antirrhinum*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

El material vegetal utilizado fue plantas de *Antirrhinum majus* 165E. Las plantas fueron sembradas inicialmente en vermiculita en una cámara de cultivo y trasladadas más tarde a los invernaderos de la Finca Experimental Tomás Ferro, donde se trasladaron a un sustrato combinado con fibra de coco, vermiculita, perlita y turba.

2.2 Estudio del efecto de la temperatura

Diez plantas de la línea *A. majus* 165E fueron colocadas en distintas cámaras de crecimiento bajo un fotoperiodo de 12 horas de luz, 12 horas de oscuridad. Las temperaturas aplicadas para el ensayo estándar fueron 22°C/16°C, el ensayo de temperatura baja fueron 15°C /5°C el ensayo de temperatura alta fueron 30°C /23°C durante el día y la noche, respectivamente. Las muestras de flores fueron tomadas en los días 0, 3 y 5 de floración (estadio o stage I, II, III) (Fig.1). Estas muestras se destinaron a la medición del tamaño de la flor y longitud del pedúnculo, la viabilidad del polen y el análisis del color. Las medidas se tomaron usando un calibre. El polen fue teñido con una solución de lactophenol blue y observado bajo el microscopio con 10 aumentos para determinar su viabilidad. Finalmente para el color de las flores se midieron las antocianinas (Fig. 2) utilizando un método de extracción con Metanol:HCL y un espectrofotómetro UV-1600 (SHIMADZU, Kyoto , Japón).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudios realizados en especies de interés en producción y floricultura muestran que el número de flores producidas por una planta y su tamaño está controlado genéticamente [6, 7], y en ocasiones como respuesta al medio ambiental.

El desarrollo de metodologías y ensayos previos en cuanto a la viabilidad del polen [3] y volátiles [8] en las especies *A. tortuosum* y *A. majus* nos proporcionan información valiosa preliminar que nos permite una comparación de estos parámetros bajo diferentes condiciones ambientales, como la temperatura.

En nuestro ensayo la viabilidad del polen fue menor en las flores aclimatadas a altas temperaturas, con una oscilación entre un 20% y un 60%, lo que puede afectar negativamente a la reproducción y la producción de semillas, mientras que en las flores aclimatadas a bajas temperaturas oscilaron entre un 90% y un 95%, (Fig. 3). El color de las flores varió entre tratamientos, el grupo de flores de bajas temperaturas presentó una mayor concentración de antocianinas [9] mientras que el grupo de altas temperaturas mostró una baja concentración (Fig. 2)

Los estudios del efecto de temperatura sobre características vegetativas y generativas en *A. majus* línea 165E se concentran a parte del análisis de la viabilidad del polen, también en la cantidad de clorofila en hojas, en el análisis de volátiles, la longitud del pedúnculo, el color de las flores y el nivel de antocianinas extraídas de tejido de pétalos bajo las diferentes temperaturas.

4. CONCLUSIONES

Las distintas condiciones de temperatura tienen un efecto sobre parámetros florales que pueden afectar al éxito de la polinización, como la viabilidad de polen, el tamaño de las flores y la concentración de antocianinas en los pétalos.

5. AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la unidad de Genética Molecular del IBV la colaboración de los doctorandos, la colaboración del SAIT y la tutela de los doctores Julia Weiss y Marcos Egea. El trabajo se enmarca dentro del proyecto BFU- 2013-45148-R y BFU-2017 88300-C2-1-R.

6. REFERENCIAS

- [1] Dudareva N., Pichersky E., Gershenzon J. 2004. Biochemistry of plant volatiles. *Plant physiol.* 135(4): 1893-1902.
- [2] Cna'ani A., Mühlemann JK., Ravid J., Masci T., Klempien A., Nguyen T., Dudareva N., Pichersky E & Vainstein A. 2015. *Petunia X hybrida* floral scent production is negatively affected by high-temperature growth conditions. *Plant, Cell and environment.* 38:1333-1346.
- [3] Bayo-Canha A., Delgado-Benarroch L., Weiss J., Egea-Cortines M. 2007. Artificial decrease of leaf area affects inflorescence quality but not floral size in *Antirrhinum majus*. *Scientia horticultrae.* 113(4):383-386.
- [4] Ruíz-Ramón F., Águila D. J., Egea-Cortines M., Weiss J. 2014. Optimization of fragrance extraction: daytime and flower age affect scent emission in simple and double narcissi. *Industrial Crops and Products.* 52:671-678.
- [5] Alaimo MG., Melati MR & Scialabba A. 1997. Pollen grain stereostructure, viability and germination; correlation with temperature of *Antirrhinum tortuosum* Bosc. *Acta Botánica Gallica.* 144:1171-181.
- [6] Byzova M. V., Franken J., Aarts M. G., de Almeida-Engler J., Engler G., Mariani C., Angenent, G. C. 1999. *Arabidopsis* STERILE APETALA, a multifunctional gene regulating inflorescence, flower, and ovule development. *Genes & development.* 13(8):1002-1014.
- [7] A Manchado-Rojo M., Delgado-Benarroch L., Roca M.J., Weiss J., Egea-Cortines M. 2012. Quantitative requirements of *Deficiens* and *Globosa* for late petal development show a complex transcriptional network topology of B function. *Plant Journal.* 72: 294-307. doi:10.1111/j.1365-313X.2012.05080.x
- [8] Ruiz-Hernández V., Hermans B., Weiss J., Egea-Cortines M. 2017. Genetic analysis of natural variation in *Antirrhinum* scent profiles identifies benzoic acid carboxymethyl transferase as the major locus controlling methyl benzoate synthesis. *Front. Plant. Sci.* 8.
- [9] Zhang X., Xu Z., Yu X., Zhao L., Zhao M., Ha X., Qi S. 2019. Identification of Two Novel R2R3-MYB Transcription factors, PsMYB114L and PsMYB12L, Related to Anthocyanin Biosynthesis in *Paonia suffruticosa*. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 1055.



Figura 1. Flores de tratamientos Standard, High y Low.

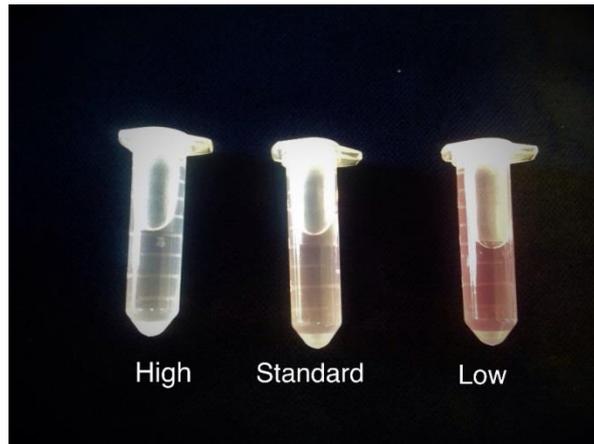


Figura 2. Antocianinas extraídas de flores en tratamientos Standard, High y Low.

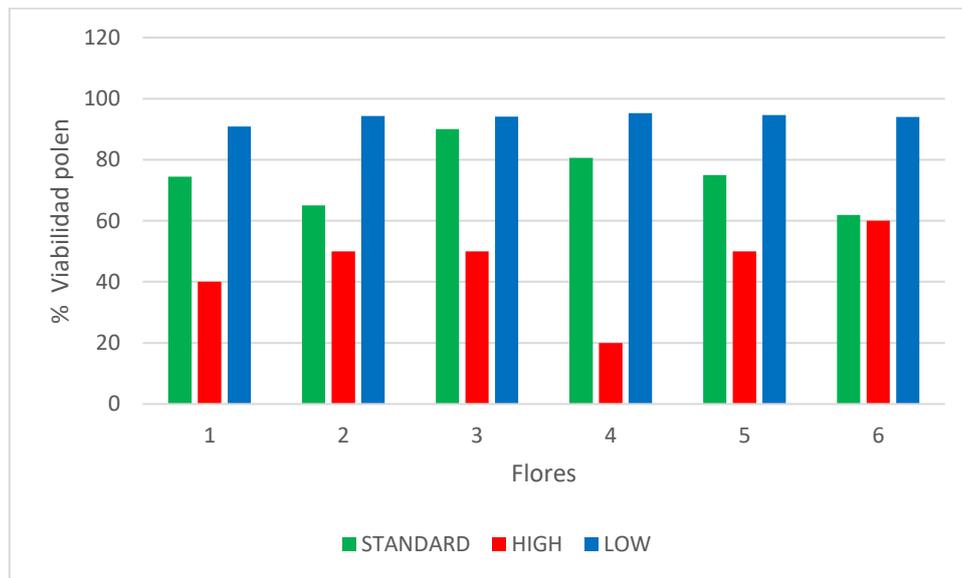


Figura 3. % Viabilidad del polen en 6 flores, en los tratamientos Standard, High y Low.

POSTERS SESSION

Denitrification of saline agricultural effluents through woodchips bioreactors in SE Spain

Desnitrificación de efluentes agrícolas salinos mediante biorreactores de madera en el SE de España

C. Díaz-García*, J.J. Martínez-Sánchez, J. Álvarez-Rogel

Departamento de Ingeniería Agronómica. ETSIA-Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203. Cartagena, Región de Murcia. Spain

*carolina.diaz@upct.es

Abstract

The serious problem existing in the Campo de Cartagena-Mar Menor area due to the high nitrate load of desalination and agricultural drainage effluents has led to the search for easy-to-implement solutions that allow removing nitrates at a reduced cost. Among the possible measures, we find the use of bioreactors which consist on lignocellulosic materials of low cost as carbon source so that microorganisms can complete the denitrification in a container, tank or ditch in which the stagnant water is kept for long enough or circulating slowly. Four types of carbon media have been tested: almond shell, chopped carob, olive bone and citrus woodchip, and it has been determined that citrus woodchips are the most suitable because show the best performance in removing nitrate (76%) being, in addition, the most economical carbon media of the four tested.

Keywords: brine; nitrates; citrus woodchip.

Resumen

El grave problema existente en la zona Campo de Cartagena-Mar Menor debido a la alta carga de nitratos de los efluentes de las desalobradoras y de las aguas de drenaje agrícola ha llevado a buscar soluciones fáciles de implantar que permitan la eliminación de nitratos con un coste reducido. En este trabajo se ha evaluado la viabilidad de utilizar biorreactores, consistentes en depósitos o zanjas rellenos de astillas de madera u otros materiales lignocelulósicos a través de los cuales se hace pasar el agua para que se produzca la desnitrificación. Se han ensayado cuatro tipos de sustratos: cáscara de almendra, troceado de algarroba, hueso de oliva y astillas de cítrico, y se ha determinado que las astillas de cítrico son el más adecuado ya que mostraron el mejor rendimiento en la eliminación de nitrato (76%) siendo, además, el sustrato más económico de los cuatro ensayados.

Palabras clave: salmuera; nitratos; astillas de cítricos.

1. INTRODUCCIÓN

Los nitratos (NO_3^-) son esenciales para obtener buenos rendimientos en los cultivos, pero también son muy solubles en agua por lo que se lixivian fácilmente a través de la matriz del suelo por lixiviado y/o son arrastrados por la escorrentía superficial, alcanzando los cursos de agua y los acuíferos y, por tanto, pudiendo ocasionar graves problemas. Debido a esto, se buscan posibles soluciones para reducir la concentración de NO_3^- en los lixiviados y efluentes procedentes de

actividades antrópicas como la agricultura, a fin de reducir la cantidad que podría llegar a las masas de agua. Una de las opciones que está ganando más interés en los últimos años son los biorreactores desnitrificadores [1]. Éstos consisten en depósitos o zanjas rellenos de astillas de madera u otros materiales lignocelulósicos de escaso coste procedentes de rechazo de otras actividades (paja, madera, cáscaras, etc.), a través de los cuales se hace pasar el agua a tratar. El aporte de carbono proporcionado por los materiales lignocelulósicos favorece la respiración microbiana aerobia, causando un descenso del nivel de oxígeno disuelto que activa a los microorganismos anaerobios facultativos, que al no disponer de oxígeno suficiente utilizan el NO_3^- como fuente aceptora de electrones dando lugar a formas de nitrógeno gaseosas (N_xO y N_2) a través del proceso de desnitrificación. Estos biorreactores se utilizan en diversas partes del mundo para desnitrificar aguas salobres con contenido de NO_3^- hasta $\approx 100 \text{ mg L}^{-1}$ [2], pero no se han usado para tratar aguas altamente salinas con contenido en NO_3^- de hasta $\geq 350 \text{ mg L}^{-1}$.

España no es ajena al problema de la lixiviación de NO_3^- , especialmente en zonas de fertirrigación intensiva como el Campo de Dalías (Almería) [3], el Campo de Cartagena (Región de Murcia) [4] o zonas de las costas valenciana o catalana [5]. En el caso del Campo de Cartagena, éste fue declarado como Zona Vulnerable a la contaminación por NO_3^- , según la Directiva 91/676/CEE, y el área del Mar Menor ha sido denominada como zona ambientalmente sensible a descargas de residuos urbanos, de conformidad con la Directiva 91/721/CEE [6].

El Campo de Cartagena tiene unas 40.000 hectáreas de cultivo intensivo de regadío abastecidas, en principio, por el Trasvase Tajo-Segura (TTS), plantas desalinizadoras de agua de mar y aguas residuales tratadas [7]. Sin embargo, debido a la sequía, a la falta de continuidad del TTS y a una producción insuficiente de agua desalada de mar, los agricultores se vieron obligados a generalizar el uso de agua de pozo procedente del acuífero cuaternario. Esto provocó una bajada del nivel freático y, como consecuencia, un aumento de la intrusión marina en dicho acuífero [8] que llevó a un aumento de su contenido en sales. A esto se sumó la lixiviación de sales, fundamentalmente NO_3^- , a causa de la actividad agrícola. Ambos factores provocaron que para poder utilizar el agua de los pozos los agricultores tuvieran que desalobrarla generando un rechazo consistente en una salmuera cargada de NO_3^- y otras sales, que ha sido vertida al Mar Menor durante años. A lo largo del tiempo el aumento de los regadíos abastecidos en parte, como ya se ha comentado, con agua del TTS, agua de mar desalinizada y aguas residuales tratadas [7], causaron, esta vez, una subida demasiado pronunciada del nivel piezométrico del acuífero cuaternario, lo que incrementó el flujo de éste hacia el Mar Menor contribuyendo de manera muy importante al aporte de NO_3^- a la laguna a través de las aguas subterráneas [9].

Como consecuencia de todas estas presiones sobre el Mar Menor, el ecosistema marino se ha visto seriamente afectado produciéndose proliferación de medusas y otros fenómenos que han contribuido a su degradación. Las afecciones culminaron con un episodio de crecimiento explosivo de fitoplancton en 2016 debido a la eutrofización, que enturbió la columna de agua impidiendo el paso de la luz a los fondos lo que provocó la muerte de más del 80% de la vegetación bentónica [4]. A raíz de esto, en febrero de 2018, el gobierno de la Región de Murcia publicó la ley 1/2018, sobre medidas urgentes para garantizar la sostenibilidad ambiental en el entorno del Mar Menor, donde prohíbe el uso de las plantas desalobradoras en el Campo de Cartagena hasta disponer de un sistema de reducción de NO_3^- que previamente haya estado verificado por el órgano autonómico competente [10].

El objetivo de este trabajo es evaluar si es viable la utilización de biorreactores para desnitrificar salmueras y otros efluentes agrícolas de elevada salinidad y alto contenido en NO_3^- en el Campo de Cartagena considerando: su eficiencia en la desnitrificación, que los efluentes de dichos biorreactores no supongan un problema medioambiental, y que la aplicación de esta técnica sea técnica y económicamente viable.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para conocer si es viable la utilización de biorreactores en el proceso de desnitrificación de salmueras y efluentes altamente salinos (conductividad eléctrica -CE- ≥ 20 dS m⁻¹, y NO₃ ≥ 200 mg L⁻¹) el primer paso fue seleccionar un sustrato adecuado para utilizar en dichos biorreactores. Para ello, se eligieron cuatro tipos de residuos orgánicos que son fácilmente localizables en el sureste español, en particular en la Región de Murcia: la cáscara de almendra, troceado de algarroba, hueso de oliva y astillas de cítrico, y se ensayó su capacidad para desnitrificar aguas con elevada salinidad (CE ≈ 19 dS m⁻¹) y alta concentración de nitratos (≈ 350 mg L⁻¹). Se realizaron tres ensayos. En el primero de ellos, los sustratos fueron inundados con salmuera durante un periodo de 36 horas, y se analizó pH, potencial redox -Eh-, CE, temperatura, concentración de NO₃⁻, carbono orgánico y nitrógeno total solubles (COS y NTS, respectivamente) en la salmuera tras 1, 12 y 36 horas de inundación (esto es, tres tiempos de retención hidráulica, TRH). El segundo ensayo tuvo una duración de 10 horas, analizándose los mismos parámetros que en el primero tras 1, 2, 4, 6, 8 y 10 horas de TRH. El tercer ensayo, de 10 horas de duración, se realizó únicamente con astillas de cítricos, que fue el sustrato que mejor resultado proporcionó en los dos primeros. En este tercer ensayo se midieron los mismos parámetros que en los anteriores tras 2, 4, 6 y 10 horas de TRH.

Una vez seleccionado el sustrato más adecuado, a lo largo de la Tesis Doctoral se estudiará la influencia de diferentes factores en el comportamiento de los biorreactores desnitrificadores, realizando ensayos en laboratorio y en finca experimental. Los factores por ensayar serán: - el tiempo de retención hidráulica (tiempo de contacto entre el sustrato y el agua a desnitrificar cuando los biorreactores se llenan); - las variaciones de temperatura dentro de los biorreactores; - la profundidad dentro de los biorreactores; - el tiempo de descanso (tiempo que los biorreactores están sin agua hasta que vuelven a llenarse), ya que los biorreactores pueden funcionar de forma intermitente o de forma continua (sin periodos de descanso de inundación).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados que se presentan en este trabajo corresponden con los obtenidos en las pruebas iniciales para la selección del sustrato más adecuado para los biorreactores.

De los cuatro tipos de sustratos analizados en el primer y segundo ensayo, los mejores rendimientos en cuanto a la reducción de nitratos se obtuvieron en las astillas de cítricos. Este sustrato alcanzó un 76% de eliminación de nitratos, que corresponde a una tasa de reducción de nitrato específica (TRNE) de (media \pm error estándar) $3,34 \pm 0,16$ kg NO₃⁻ kg biomasa⁻¹ d⁻¹, seguida de la cáscara de almendra (65% y TRNE $1,70 \pm 0,21$ kg NO₃⁻ kg biomasa⁻¹ d⁻¹). Por el contrario, los huesos de oliva y el troceado de algarroba no fueron útiles para este propósito debido a su reducida eficiencia en la reducción de nitratos y a que generaron un lixiviado muy salino el primero y uno ácido con extremadamente alto contenido de carbono orgánico soluble el segundo. En el tercer ensayo, realizado sólo con astillas de cítricos, se alcanzó una eficiencia de $\approx 12\%$ tras 1 hora de TRH (TRNE = de $10,75 \pm 2,38$ kg NO₃⁻ kg biomasa⁻¹ d⁻¹) y de $\approx 93\%$ tras 10 horas de TRH (TRNE = $4,05 \pm 0,01$ kg NO₃⁻ kg biomasa⁻¹ d⁻¹).

Según el mercado actual, un metro cúbico de cáscara de almendra cuesta 19 €, de troceado de algarroba 96 €, de hueso de oliva 36 € y de astillas de cítrico 5,76 €. Por lo tanto, según estas estimaciones, la astilla de cítricos no sólo es el medio más eficiente para desnitrificar sino también el económicamente más favorable.

4. CONCLUSIONES

A pesar de la alta salinidad de la salmuera, los resultados obtenidos en los primeros ensayos indicaron que los biorreactores son una opción adecuada para realizar el proceso de desnitrificación de salmuera y efluentes salinos. Las astillas de cítricos mostraron la mejor relación rendimiento en la desnitrificación-precio y por tanto se consideran los más adecuados para su uso en los biorreactores. La segunda opción sería la cáscara de almendra ya que es uno de los residuos orgánicos más abundantes en el área Mediterránea, pero probablemente su elevado coste y el carbono orgánico recalcitrante que contiene, limitarían su aplicación. El troceado de algarroba y el hueso de oliva no se consideran adecuados ya que no eliminaron el nitrato de la salmuera, poseen un elevado precio y no son respetuosos con el medio ambiente por las características de los lixiviados que generan.

5. AGRADECIMIENTOS

Este proyecto está siendo financiado parcialmente por la Cátedra de Agricultura Sostenible para el Campo de Cartagena, y por la entidad de saneamiento y depuración de aguas residuales de la Región de Murcia (ESAMUR). Carolina Díaz García fue becaria de la Cátedra y actualmente está contratada a cargo de un proyecto Art. 83 suscrito entre la UPCT y ESAMUR.

6. REFERENCIAS

- [1] Christianson L., Castelló A., Christianson R., Helmers M., A. Bhandari. 2010. Hydraulic property determination of denitrifying bioreactor fill media. *Appl. Eng. Agric.* 26 (5): 849-854.
- [2] von Ahnen M., Aalto S. L., Suurnäkki S., Tirola M., Pedersen P. B. 2019. Salinity affects nitrate removal and microbial composition of denitrifying woodchip bioreactors treating recirculating aquaculture system effluents. *Aquaculture* 504: 182-189.
- [3] Izcarra S. P. 2000. La directiva nitratos en España (el ejemplo del Campo de Dalías, Almería). *Estud. Agrosociales y Pesq.* 2000. 186: 203-226.
- [4] Comité de Asesoramiento Científico del Mar Menor 2017. Informe integral sobre el estado ecológico del Mar Menor». Pp.127.
- [5] Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. 2020. Actividades del Ministerio durante 2012. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Fecha de consulta: 15 marzo 2019. Disponible en: https://www.miteco.gob.es/es/ministerio/servicios/publicaciones/09-II-E-Agua_tcm30-84041.pdf
- [6] Castejón-Porcel G., Espín-Sánchez D., Ruiz-Álvarez V., García-Marín R., Moreno-Muñoz D. 2018. Runoff water as a resource in the Campo de Cartagena (region of Murcia): Current possibilities for use and benefits. *Water* 10 (4): 1-25.
- [7] Baudron P., Barbecot F., García-Aróstegui J. L., Leduc C., Travi Y., Martínez-Vicente D. 2014. Impacts of human activities on recharge in a multilayered semiarid aquifer (Campo de Cartagena, SE Spain). *Hydrol. Process.* 28 (4): 2223-2236.
- [8] Rey J., Martínez J., Barberá G. G., García-Aróstegui J. L., García-Pintado J., Martínez-Vicente D. 2013. Geophysical characterization of the complex dynamics of groundwater and seawater exchange in a highly stressed aquifer system linked to a coastal lagoon (SE Spain). *Environ. Earth Sci.* 70 (5): 2271-2282.
- [9] Rodríguez Estrella T. 2000. El Mar Menor y sus relaciones con las aguas subterráneas del continente. *N. Engl. J. Med.* 200: 981.
- [10] BORM. 2018. Prohibición de usar agua desalobrada sin desnitrificar.

Assessment of crop diversification public policies

Evaluación de políticas públicas sobre la diversificación de cultivos

C. Marín^{1*}, J.M. Martínez-Paz², F. Alcón¹

¹Departamento de Economía de la Empresa. Área de Economía, Sociología y Política Agraria. Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203, Cartagena, Murcia. Spain

²Departamento de Economía Aplicada. Facultad de Economía y Empresa. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. 30100, Murcia. Spain

*cristina.marin@upct.es

Abstract

The current agrarian model seeks to maximize food production, for which high inputs are required to the agroecosystem. It can lead to environmental deterioration. However, there are opportunities to improve the agrarian model towards a more sustainable one. One of them is crop diversification.

In recent times, the agriculture management policies are focused on increasing the sustainability and resilience of agrarian systems through the diversification of crops and the promotion of the biodiversity of agroecosystems. In this sense, the social and farmer support for these changes is fundamental to the triumph of these policies.

In this context, the Ecosystem Services approach can be very useful to assess and evaluate the social and environmental benefits of crop diversification, as well as the additional contributions that these practices have with respect to monoculture, the system of most widespread cultivation at present.

Keywords: agricultural policies; crop diversification; Ecosystem Services; social welfare.

Resumen

El modelo agrario actual busca maximizar la producción de alimentos, para lo cual se requieren altos insumos al agroecosistema, lo que puede derivar en un deterioro medioambiental. No obstante, existen oportunidades de mejora del modelo agrario hacia uno más sostenible. Una de ellas es, sin duda, la diversificación de cultivos.

En los últimos tiempos, las políticas de gestión de la agricultura están enfocadas a incrementar la sostenibilidad y la resiliencia de los sistemas agrarios a través de la diversificación de cultivos y el fomento de la biodiversidad de los agroecosistemas. En este sentido, el apoyo social y de los agricultores a estos cambios es fundamental para el triunfo de estas políticas.

En este contexto, el enfoque de los Servicios Ecosistémicos puede resultar de gran utilidad para valorar y evaluar los beneficios sociales y ambientales de la diversificación de cultivos, así como las aportaciones adicionales que tienen estas prácticas con respecto al monocultivo, el sistema de cultivo más extendido en la actualidad.

Palabras clave: políticas agrarias; diversificación de cultivos; Servicios Ecosistémicos; bienestar social.

1. INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente, la investigación relacionada con los agroecosistemas se enfocaba a maximizar el rendimiento de los cultivos o a optimizar el uso de los recursos. Así, el monocultivo ha sido el principal sistema de cultivo investigado. No obstante, recientemente ha aparecido un interés creciente por la diversificación de cultivos como alternativa al monocultivo, que permitiría sistemas más resilientes y con menores impactos negativos sobre el medioambiente [1, 2].

Por otra parte, la agricultura no sólo aporta los productos derivados de las cosechas, sino que proporciona una serie de beneficios denominados Servicios Ecosistémicos [3]. Estos beneficios son con frecuencia ajenos al mercado, aunque su valor para la sociedad puede ser más alto que el de los productos de mercado [4]. De hecho, el estudio de los Servicios Ecosistémicos ha sido el punto central de numerosos trabajos de actualidad, tanto en el campo de la clasificación de estos servicios [5, 6, 7] como en su puesta en valor en diferentes tipos de sistemas, como los agroecosistemas, a través del análisis de las preferencias sociales [8, 9, 10]. En este contexto, la diversificación de cultivos puede incrementar la provisión de Servicios Ecosistémicos, que se ha reducido debido a la intensificación de los cultivos.

La tesis que aquí se propone se encuentra enmarcada en el proyecto “Diverfarming. Crop diversification and low-input farming across Europe: from practitioners’ engagement and ecosystems services to increased revenues and value chain organization”. Este Proyecto europeo está financiado principalmente por la Unión Europea, a través del Programa Marco Horizonte 2020, y tiene por objetivo el análisis de los beneficios de la diversificación de cultivos desde una perspectiva multidisciplinar.

El objetivo general del proyecto es evaluar la percepción y la demanda social por la diversificación de cultivos, analizando la valoración de los beneficios que puede aportar esta práctica, y valorando diferentes políticas agrarias para fomentar el cambio hacia una agricultura diversificada, más sostenible y resiliente. La culminación de este objetivo tendrá lugar mediante el alcance de los objetivos específicos: (1) revisión bibliográfica de la conceptualización de los Servicios Ecosistémicos; (2) realización de una adaptación de los Servicios Ecosistémicos para su tratamiento en los agroecosistemas; (3) validación de dicha adaptación; (4) revisión bibliográfica del uso de los Servicios Ecosistémicos para la gestión de ecosistemas y el establecimiento de políticas; (5) valoración de la demanda social por un sistema agrario basado en la diversificación de cultivos; (6) valoración de la disposición de los agricultores al cambio hacia una agricultura diversificada; y (7) elaboración de una guía para el desarrollo de políticas de agricultura sostenible, optimizando los beneficios económicos, sociales y ambientales.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Área de estudio

Aunque el proyecto Diverfarming analiza la diversificación de cultivos en todas las regiones pedoclimáticas de Europa, este proyecto pretende tener como área de estudio la región del Mediterráneo Sur a través del análisis de dos casos de estudio del proyecto que se desarrollan en la Región de Murcia. Esta zona se caracteriza por contar con superficie de cultivo de secano y, además, por un sistema de regadío dual en el que existe una agricultura tradicional y diversificada en la vega del Río Segura, y un regadío intensivo de altos insumos centrado en maximizar la producción de alimentos. Además, el incremento de la disponibilidad del recurso hídrico desde el establecimiento del Trasvase Tajo-Segura (1979), ha favorecido la agricultura de regadío intensivo, incluso en zonas en las que tradicionalmente predominaba el secano.

2.2 Metodología

El análisis de las preferencias, tanto de los expertos como de la población en general, se realizará mediante métodos de preferencias declaradas. Más concretamente, se llevará a cabo el desarrollo de varios experimentos de elección, que son útiles para la evaluación de políticas y modelos de gestión [11]. De este modo, un experimento de elección puede proporcionar a los gestores una mayor comprensión del sistema y la información de qué atributos aumentan o reducen el bienestar social [12].

La teoría de la utilidad multi-atributo [13] y la teoría de la utilidad aleatoria [14] son las que proporcionan los fundamentos teóricos a los experimentos de elección. En ellos, un individuo debe elegir una alternativa (definida por una serie de atributos y niveles de los mismos) entre una serie de ellas, entre las que se encuentra la situación actual o *status quo*. La alternativa seleccionada será la que reporte una mayor utilidad para el individuo [14]. Además, se asume el principio de independencia de alternativas irrelevantes [15] para la estimación de las funciones de utilidad a través de un modelo logístico condicional. De ese modo, un experimento de elección permite analizar la provisión de distintos atributos (en el caso de este trabajo, Servicios Ecosistémicos) que definen un bien, así como la relación entre dichos atributos [16].

Otros estudios previos similares han empleado la misma metodología para la valoración de agroecosistemas o para la valoración o evaluación de políticas o enfoques de gestión en los mismos [8, 9, 17, 18, 19].

3. RESULTADOS ESPERADOS

Los resultados obtenidos en este estudio serán comparados con estudios previos similares. Eso permitirá una evaluación detallada de las políticas actuales y potenciales para alcanzar la gestión sostenible de los agroecosistemas. Concretamente, se buscará esa gestión a través de la diversificación de cultivos como alternativa al monocultivo.

Además, el enfoque de la participación ciudadana se propondrá como herramienta para garantizar una mejor aceptación por parte de la sociedad de innovaciones en las políticas de gestión. En concreto, los experimentos de elección han sido ampliamente empleados en la valoración medioambiental [12]. Además, existen trabajos [20] que han analizado percepciones sociales sobre la provisión de Servicios Ecosistémicos en un clima Mediterráneo semiárido, en el que se enmarca también este trabajo. Así, los resultados serán contrastables mediante estudios previos compatibles.

4. CONCLUSIONES

A través de este trabajo se pretende extraer conclusiones concernientes a (1) la utilidad de la valoración de los beneficios ambientales derivados de los agroecosistemas para la gestión de los mismos; (2) la importancia de los Servicios Ecosistémicos de no mercado para la evaluación de políticas agrarias; y (3) la percepción social acerca de la diversificación de cultivos.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto Diverfarming [Grant Agreement 728003], en el marco Horizonte 2020 de la Comisión Europea.

6. REFERENCIAS

- [1] Lin B.B. 2011. Resilience in agriculture through crop diversification: adaptive management for environmental change. *BioScience* 61(3): 183-193.
- [2] Altieri M.A., Nicholls C.I., Henao A., Lana M.A. 2015. Agroecology and the design of climate change-resilient farming systems. *Agron. Sustain. Dev.* 35(3): 869-890.
- [3] Costanza R., d'Arge R., De Groot R.S., Farber S., Grasso M., Hannon B., Limburg K., Naeem S., O'Neill R.V., Paruel J., Raskin R.G., Sutton P., Van den Belt M. 1997. The value of the world's ecosystem service and natural capital. *Nature* 387: 253-260.
- [4] Sandhu H.S., Wratten S. D., Cullen R., Case B. 2008. The future of farming: the value of ecosystem services in conventional and organic arable land. An experimental approach. *Ecol. Econ.* 64: 835-848.
- [5] Millennium Ecosystem Assessment (MEA) 2005. *Ecosystems and Human Well-being: Synthesis*. Island Press, Washington, DC.
- [6] TEEB Synthesis 2010. *Mainstreaming the Economics of Nature: A Synthesis of the Approach Conclusions and Recommendations of TEEB*. Earthscan, London, Washington.
- [7] Haines-Young R., Potschin M. 2012. Common international classification of ecosystem services (CICES, Version 4.1). European Environment Agency, 33.
- [8] Rodríguez-Ortega, T., Bernués, A., & Alfnes, F. 2016. Psychographic profile affects willingness to pay for ecosystem services provided by Mediterranean high nature value farmland. *Ecol. Econ.* 128: 232-245.
- [9] Ragkos A., Theodoridis A. 2016. Valuation of environmental and social functions of the multifunctional Cypriot agriculture. *Land Use Policy*, 54: 593-601.
- [10] Novikova A., Rocchi, L., Vitunskienė V. 2017. Assessing the benefit of the agroecosystem services: Lithuanian preferences using a latent class approach. *Land Use Policy*, 68, 277-286.
- [11] Hensher D.A., Johnson L. W. 1981. Behavioural response and form of the representative component of the indirect utility function in travel choice models. *Reg. Sci. Urban Econ.* 11(4): 559-572.
- [12] Hoyos D., 2010. The state of art of environmental valuation with discrete choice experiments. *Ecol. Econ.* 69(8): 1595-1603.
- [13] Lancaster, K.J. 1966. A new approach to consumer theory. *J. Polit. Econ.* 74(2): 132-157.
- [14] McFadden D. 1974. Conditional logit analysis of qualitative choice behavior. In: *Frontiers in Econometrics*. Zarembka, P., ed., Academic Press, New York, Pp. 105-142.
- [15] Louviere J., Hensher D.A., Joffre D. 2000. *Stated Choice Methods. Analysis and application*. Cambridge University Press, Cambridge.
- [16] Bateman I.J., Carson R.T., Day B., Hannemann M., Hanley N., Hett T., Jones-LCE M., Loomes G., Mourato S., Ozdemiroglu E., Pearce D.W., Sugden R., Swanson J., 2002. *Economic Valuation with Stated Preference Techniques: A Manual*. Edward Elgar, Northampton.
- [17] Hanley N., Wright R.E., Adamowicz V. 1998. Using choice experiments to value the environment. *Environmental and resource economics*, 11(3-4): 413-428.
- [18] Dias V., Belcher K. 2015. Value and provision of ecosystem services from prairie wetlands: A choice experiment approach. *Ecosyst. Serv.* 15: 35-44.
- [19] Jourdain D., Vivithkeeyoonvong, S. 2017. Valuation of ecosystem services provided by irrigated rice agriculture in Thailand: a choice experiment considering attribute nonattendance. *Agr. Econ.* 48(5): 655-667.
- [20] Castro A J., Martín-López B., García-Llorente M., Aguilera P.A., López E., Cabello J. 2011. Social preferences regarding the delivery of ecosystem services in a semiarid Mediterranean region. *J. Arid Environ.* 75(11): 1201-1208.

New techniques to improve fertigation efficiency with nitrification inhibitors in lettuce (*Lactuca sativa* L.) in Murcia

Nuevas técnicas para mejorar la eficiencia de la fertirrigación mediante el uso de inhibidores de la nitrificación en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) en la Región de Murcia

P. Berríos*, A. Pérez-Pastor, A. Temnani, D. Pérez, I. Gil, M. Forcén, S. Zapata, S. Bañón

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

*pablo.berrios@edu.upct.es

Abstract

Nitrogen (N) is an essential element for the growth of plants and is the nutrient that is usually applied in greater quantity in agriculture, but a significant amount can be lost through leaching, gaseous emissions and volatilization of NH₃; increasing production costs and negatively impacting the environment. The nitrification inhibitors (NI) allow reducing these losses, simplifying the fertilization management, reducing costs and facilitating greater flexibility in the time of application. The essential problem of horticultural crops in Murcia is the optimized management of water and nutrients, so the incorporation of NI must be subject to protocols that are not yet defined in intensive agriculture. The general objective of the research is to develop, from a multidisciplinary point of view, efficient and sustainable criteria for the management of lettuce fertigation through the use of NI fertilizers and the monitoring of the soil-plant-atmosphere system, to improve the efficiency of the use of water and nutrients, meet the quality standards required for export and reduce the emission of greenhouse gases according to the local edaphoclimatic conditions of Murcia.

Keywords: DMPP; DCD-TZ; TZ-MP; soil-plant-atmosphere; water potential; greenhouse gases.

Resumen

El nitrógeno (N) es un elemento esencial para el crecimiento de las plantas y es el nutriente que se suele aplicar en mayor cantidad en la agricultura, pero se puede perder una cantidad significativa por la lixiviación, emisiones gaseosas y volatilización de NH₃; aumentando los costos de producción e impactando negativamente sobre el medio ambiente. Los inhibidores de la nitrificación (IN) permiten reducir estas pérdidas, simplificar la tarea de fertilización, disminuir costos y facilitar una mayor flexibilidad en el tiempo de aplicación. La problemática esencial de los cultivos hortícolas en Murcia es el manejo optimizado de agua y nutrientes por lo que la incorporación de IN debe someterse a protocolos que aún no están definidos en la agricultura intensiva. El objetivo general de la investigación es elaborar desde un punto de vista multidisciplinar criterios eficientes y sostenibles para el manejo de la fertirrigación de lechuga mediante el uso de fertilizantes

con IN y la monitorización del sistema suelo-planta-atmósfera, para mejorar la eficiencia del uso del agua y nutrientes, cumplir los estándares de calidad exigidos para la exportación y disminuir la emisión de gases de efecto invernadero según las condicionantes edafoclimáticas locales de Murcia.

Palabras clave: DMPP; DCD-TZ; TZ-MP; suelo-planta-atmósfera; potencial hídrico; gases efecto invernadero.

1. INTRODUCCION

El nitrógeno (N) es un elemento esencial para el crecimiento de las plantas y es el nutriente que se suele aplicar en mayor cantidad en la agricultura, pero incluso mediante estrategias de fertilización optimizadas se puede perder una cantidad significativa del N aplicado al suelo, a través de la lixiviación de nitrato (NO_3^-), emisiones gaseosas en forma de óxidos de nitrógeno (NO_x y N_2O) procedentes de la nitrificación y desnitrificación, y la volatilización de NH_3 [1]. Estas pérdidas no sólo representan una carga económica innecesaria, sino que impactan negativamente sobre el medio ambiente. El fertilizante nitrogenado ideal debe i) permitir lograr un crecimiento óptimo de las plantas con una sola aplicación; ii) presentar mínimas pérdidas y iii) minimizar los efectos perjudiciales sobre el suelo, el agua y la atmósfera. Los fertilizantes nitrogenados asociados con la nitrificación o los inhibidores de la ureasa coinciden en gran medida con éstas características y se están utilizando dada su efectividad y el amplio espectro de cultivos a los que se puede aplicar [1].

En 1962, la nitrapirina (2-cloro-6- triclorometil piridina) se introdujo como inhibidor de la nitrificación (IN) en EE.UU. [2]. Además de ésta, actualmente están disponibles: diciandiamida + 1H-1,2,4-triazol (DCD-TZ), 3,4-dimetilpirazol fosfato (DMPP) [1,3] y 1H-1,2,4-triazol y 3-metilpirazol (TZ-MP). En los fertilizantes minerales el DMPP generalmente se agrega al nitrato de sulfato de amonio y el DCD-TZ se agrega a la urea, mientras que el TZ-MP está disponible para fertilizantes orgánicos líquidos.

La nitrificación es un proceso clave de transformación del N, en donde el amonio (NH_4^+) o amoníaco (NH_3) es oxidado a nitrato (NO_3^-) en dos reacciones: i) oxidación de amonio a nitrito por bacterias del género *Nitrosomonas* y ii) oxidación del nitrito (NO_2^-) por bacterias del género *Nitrobacter*. Los IN actúan reduciendo la actividad de la primera reacción, lo que retrasa el proceso de oxidación. El uso de fertilizantes con IN podría incrementar la disponibilidad de amonio en el suelo para la nutrición del cultivo, debido a una proporción adecuada entre NO_3^- y NH_4^+ en la solución del suelo, pudiéndose así incrementar el uso eficiente de N, al reducirse las pérdidas por lixiviación de NO_3^- y disminuyendo el contenido de nitratos en las hojas de lechuga [4]. Sin embargo, se observó una reducción de la biomasa alcanzada por lechugas fertilizadas con N en forma amoniacal, debido a la sensibilidad que muestran ciertos cultivos al amonio [5].

Dado que el NO_3^- es muy soluble en agua, se producen pérdidas por lixiviación cuando existen precipitaciones o riegos que superan la lámina de agua que puede retener el volumen de suelo ocupado por el sistema radicular, y por tanto el uso de IN podría minimizarlas. Varios estudios han demostrado que la lixiviación de NO_3^- después de la aplicación de fertilizantes minerales N puede reducirse significativamente con la adición de DCD [6,7] o DMPP [8]. Al realizar una gestión eficiente del riego, en el que la lixiviación de NO_3^- junto con el agua de riego sea limitada, además de incrementar la eficiencia del uso del agua, también se incrementa de manera considerable la eficiencia en el uso de nitrógeno, fósforo y potasio; tal es el caso de ensayos realizados en albaricoquero [9] y uva de mesa [10]. Además, se promueve una reducción significativa de la emisión de CO_2 y N_2O desde el suelo [11].

La adición de IN permite reducir las pérdidas de N en forma gaseosa, ya sea como óxidos de N (NO_x) y/o óxido nitroso (N_2O). Akiyama et al. (2010) reportaron que los IN redujeron las emisiones de N_2O y NO en aproximadamente 38% y 46%, respectivamente [12] y la adición de DCD redujo un 40% las emisiones de N_2O [13]. DMPP también permitió reducir las emisiones de N_2O de fertilizante mineral [12] y orgánico [14].

Más allá de reducir las pérdidas de N, el uso de IN también puede simplificar la tarea de fertilización en la producción intensiva de cultivos y disminuir costos de mano de obra y maquinaria al reducir el número de aplicaciones [15] o facilitar una mayor flexibilidad en el tiempo de aplicación por la liberación más lenta de N [16]. Este beneficio es cada vez más importante frente al cambio climático, donde una mayor flexibilidad ofrece la posibilidad de reducir el riesgo asociado con períodos de sequía o lluvia prolongados. En el primer caso, existe la opción de aplicar fertilizantes N más temprano en la temporada para evitar que la sequía no permita la disolución del fertilizante y la absorción de N, mientras que durante períodos de lluvia extensos se pueden evitar las posibles pérdidas por lixiviación. Todo lo anterior permite reducir los costos de cultivo y la compactación del suelo por el tráfico de maquinaria.

Respecto del efecto de los IN sobre el rendimiento, la adición de DMPP bajo distintas condiciones edafoclimáticas en Europa permitió incrementar la producción de trigo invernal, arroz, maíz, patata, remolacha azucarera y hortalizas [17]. En Alemania se incrementó entre 1-6% el rendimiento de cereales de invierno, colza, maíz, patata y remolacha azucarera [18]. Sin embargo, otros autores han reportado que el rendimiento no se ve afectado por el uso de IN; en la producción de patata no se observó ningún cambio en respuesta a la aplicación de DCD [19] y sólo en una de cinco pruebas realizadas se incrementó el rendimiento de tubérculos [20]. En otros estudios en granos y tubérculos no se pudo probar el aumento del rendimiento al agregar IN, pero se observó una reducción del contenido de proteína cruda del trigo de invierno [15]. Esto destaca la importancia de estudiar la posible influencia del uso de IN sobre la calidad nutricional de las plantas. La lechuga es rica en vitamina A (caroteno), vitamina C (ácido ascórbico), hierro y calcio [21].

Según FAO, mundialmente se cultivan 1.148.353 ha de lechugas y escarolas con una producción de 24.896.115 t. China, EE.UU. e India son los principales productores. Murcia y Almería en España se presentan como las únicas zonas con el clima adecuado para la producción de lechuga al aire libre en invierno en Europa y su producción está destinada mayoritariamente para la exportación a países europeos [22].

La problemática esencial que presenta un cultivo hortícola en Murcia es el manejo optimizado de agua y nutrientes, y especialmente el nitrógeno. La incorporación de IN en los abonados debe someterse a protocolos que aún no están definidos en la agricultura intensiva, por lo que es necesario comprobar la idoneidad de su uso según las condicionantes edafoclimáticas locales.

El objetivo general de la investigación es elaborar desde un punto de vista multidisciplinar criterios eficientes y sostenibles para el manejo de la fertirrigación de lechuga mediante el uso de fertilizantes con inhibidores de la nitrificación y la monitorización del sistema suelo-planta-atmósfera, para mejorar la eficiencia del uso del agua y nutrientes, cumplir los estándares de calidad exigidos para la exportación, disminuir la emisión de gases de efecto invernadero

2. REFERENCIAS

[1] Trenkel, M.E., 2010. Slow-and Controlled-Release and Stabilized Fertilizers: An Option for Enhancing Nutrient Use Efficiency in Agriculture.

[2] Goring, C.A.I., 1962. CONTROL OF NITRIFICATION BY 2-CHLORO-6-(TRICHLORO-METHYL) PYRIDINE. *Soil Sci.* 93, 211-218. <https://doi.org/10.1097/00010694-196203000-00010>

- [3] Zerulla, W., Barth, T., Dressel, J., Erhardt, K., Horchler von Locquenghien, K., Pasda, G., Rädle, M., Wissemeier, A., 2001. 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) - a new nitrification inhibitor for agriculture and horticulture. *Biol. Fertil. Soils* 34, 79–84. <https://doi.org/10.1007/s003740100380>
- [4] Huérfano, X., Menéndez, S., MM, B.-B., MB, G.-M., JM, E., González-Murua, C., 2016. The nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate decreases leaf nitrate content in lettuce while maintaining yield and N₂O emissions in the Savanna of Bogotá. *Plant, Soil Environ.* 62, 533–539. <https://doi.org/10.17221/105/2016-PSE>
- [5] Cruz, C., Bio, A.F.M., Domínguez-Valdivia, M.D., Aparicio-Tejo, P.M., Lamsfus, C., Martins-Loução, M.A., 2006. How does glutamine synthetase activity determine plant tolerance to ammonium? *Planta* 223, 1068–1080. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0155-2>
- [6] Ball-Coelho, B.R., Roy, R.C., 1999. Enhanced ammonium sources to reduce nitrate leaching. *Nutr. Cycl. Agroecosystems* 54, 73–80. <https://doi.org/10.1023/A:1009773428011>
- [7] Serna, M.D., Bañuls, J., Quiñones, A., Primo-Millo, E., Legaz, F., 2000. Evaluation of 3,4-dimethylpyrazole phosphate as a nitrification inhibitor in a Citrus -cultivated soil. *Biol. Fertil. Soils* 32, 41–46. <https://doi.org/10.1007/s003740000211>
- [8] Arregui, L.M., Quemada, M., 2006. Drainage and nitrate leaching in a crop rotation under different N-fertilizer strategies: application of capacitance probes. *Plant Soil* 288, 57–69. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9064-9>
- [9] Pérez-Pastor, A., Domingo, R., Torrecillas, A., Ruiz-Sánchez, M.C., 2009. Response of apricot trees to deficit irrigation strategies. *Irrig. Sci.* 27, 231–242. <https://doi.org/10.1007/s00271-008-0136-x>
- [10] Conesa, M.R., de la Rosa, J.M., Artés-Hernández, F., Dodd, I.C., Domingo, R., Pérez-Pastor, A., 2015. Long-term impact of deficit irrigation on the physical quality of berries in 'Crimson Seedless' table grapes. *J. Sci. Food Agric.* 95, 2510–2520. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6983>
- [11] Zornoza, R., Rosales, R.M., Acosta, J.A., de la Rosa, J.M., Arcenegui, V., Faz, Á., Pérez-Pastor, A., 2016. Efficient irrigation management can contribute to reduce soil CO₂ emissions in agriculture. *Geoderma* 263, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2015.09.003>
- [12] Akiyama, H., Yan, X., Yagi, K., 2010. Evaluation of effectiveness of enhanced-efficiency fertilizers as mitigation options for N₂O and NO emissions from agricultural soils: meta-analysis. *Glob. Chang. Biol.* 16, 1837–1846. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.02031.x>
- [13] Skiba, U., Smith, K.A., Fowler, D., 1993. Nitrification and denitrification as sources of nitric oxide and nitrous oxide in a sandy loam soil. *Soil Biol. Biochem.* 25, 1527–1536. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(93\)90007-X](https://doi.org/10.1016/0038-0717(93)90007-X)
- [14] Dittert, K., Bol, R., King, R., Chadwick, D., Hatch, D., 2001. Use of a novel nitrification inhibitor to reduce nitrous oxide emission from ¹⁵N-labelled dairy slurry injected into soil. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15, 1291–1296. <https://doi.org/10.1002/rcm.335>
- [15] Hu, Y., Schraml, M., von Tucher, S., Li, F., Schmidhalter, U., 2014. Influence of nitrification inhibitors on yields of arable crops: A meta-analysis of recent studies in Germany. *Gorgan Univ. Agric. Sci.* 8, 33–50. <https://doi.org/10.22069/IJPP.2014.1371>
- [16] Linzmeier, W., Gutser, R., Schmidhalter, U., 2001. The new nitrification inhibitor DMPP (ENTEC®) allows increased N-efficiency with simplified fertilizing strategies, in: *Plant Nutrition*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 760–761. https://doi.org/10.1007/0-306-47624-X_369
- [17] Pasda, G., Hähndel, R., Zerulla, W., 2001. Effect of fertilizers with the new nitrification inhibitor DMPP (3,4-dimethylpyrazole phosphate) on yield and quality of agricultural and horticultural crops. *Biol. Fertil. Soils* 34, 85–97. <https://doi.org/10.1007/s003740100381>
- [18] Wozniak, H., Michel, H., Fuchs, M., 1999. Nitrification inhibitors for economically efficient and environmental friendly nitrogen fertilization, in: IFA (Ed.), *Proceedings of IFA Agricultural Conference on Managing Plant Nutrition*. International Fertilizer Industry Association (IFA), Barcelona, pp. 182–194.
- [19] Munzert, M., 1984. Field experiments on potatoes with ALZON, in: *Nitrification Inhibition Symposium*. VDLUFA, Darmstadt.
- [20] Martin, H.W., Graetz, D.A., Locascio, S.J., Hensel, D.R., 1993. Nitrification Inhibitor Influences on Potato. *Agron. J.* 85, 651. <https://doi.org/10.2134/agronj1993.00021962008500030024x>
- [21] Ananda, M.A.I.D. Ahundeniya, W.M.K.B., 2012. Effect of different hydroponic systems and media on growth of lettuce (*Lactuca sativa*) under protected culture.
- [22] Marhuenda, J., García, J., 2017. Lechuga, in: *Cultivos Hortícolas Al Aire Libre*. Cajamar Caja Rural, p. 788.

Enhanced of bioactive compounds in cruciferous sprouts by the use of LED lights

Potenciación de compuestos bioactivos en brotes de crucíferas mediante el empleo de luces LED

A. Abellán*, D.A. Moreno, C. García-Viguera

Laboratorio de Fitoquímica y Alimentos Saludables, Dpto Ciencia y Tecnología de Alimentos, CEBAS-CSIC, Campus Universitario de Espinardo, 25, 30100, Murcia. Spain

*avictorio@cebas.csic.es

Abstract

LED light (light emitting diode) is a promising emergent technology that has been employed in the field of food engineering. The elicitation of plants produced under LED lights has shown an improvement in the content of bioactive compounds. In this sense, cruciferous sprouts like broccoli (*Brassica oleracea*) or radish (*Raphanus sativus*), are rich in secondary metabolites with interest for the human health (glucosinolates, isothiocyanates and phenolic compounds). Nevertheless, these concentrations can be modified by the use of sequential treatments of LED lights with different wavelengths. However, actually it is necessary more research to reach the optimization of this technique in the food industry. In addition, there is not enough information in the literature about the effect of the LED light on the different aspects of the physiology of the plants.

Keywords: Light Emitting Diode; *Brassica*; glucosinolates; phenolic compounds; elicitation.

Resumen

Las luces LED (diodo emisor de luz) son una tecnología emergente muy prometedora que, actualmente, está siendo empleada en el campo de la ingeniería alimentaria. La elicitación (bioestimulación) de plantas producidas bajo luces LED ha mostrado una mejora en el contenido de compuestos bioactivos. En este sentido, los brotes de crucíferas como el brócoli (*Brassica oleracea*) o el rábano (*Raphanus sativus*), son una fuente de metabolitos secundarios con gran interés en la salud humana (glucosinolatos, isotiocianatos y compuestos fenólicos), cuyas concentraciones pueden ser modificadas mediante el uso de tratamientos secuenciales de luces LED, con diferentes longitudes de onda. Sin embargo, actualmente, es necesario profundizar en investigaciones para lograr una optimización de esta técnica en la industria alimentaria. Además, no existe suficiente información en la literatura sobre el efecto de las luces LED en los diferentes aspectos de la fisiología de las plantas.

Palabras clave: diodo emisor de luz; *Brassica*; glucosinolatos; compuestos fenólicos; elicitación.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, las tendencias nutricionales de los consumidores no han hecho más que evolucionar. Cada vez más, la preocupación por la salud va en aumento, y esto ha provocado un auge en la incorporación de alimentos saludables en los hábitos dietéticos. En este sentido, el

consumidor demanda productos de calidad, y se interesa por aquellos alimentos que puedan aportar beneficios para su salud. Todo esto ha impulsado el consumo de nuevos alimentos como los brotes de origen vegetales; los cuales son importantes fuentes alimentarias de macronutrientes (bajo contenido en hidratos de carbono y gran presencia de grasas saludables, proteínas y fibra), micronutrientes (vitaminas y minerales) y no-nutrientes (compuestos fitoquímicos) [1]. En este sentido, los brotes de crucíferas (brócoli, rábano, kale, mostaza, entre otros), se caracterizan por su alto contenido en compuestos nitrogenados y azufrados (glucosinolatos y sus derivados: isotiocianatos), así como en compuestos fenólicos (predominantemente ácidos fenólicos, flavonoles y antocianos) [2] [3]. Además, los brotes tienen un interés comercial muy alto debido, no solo a sus cualidades nutricionales, sino también a su rápido desarrollo (7-9 días de crecimiento) y a sus bajos costes de producción.

Los glucosinolatos son metabolitos secundarios resultantes de una respuesta de la planta a un estrés. La estructura general consiste en una molécula de glucosa unida a un grupo tiohidroximato-o-sulfonato y a un aminoácido [4]. Sin embargo, no son moléculas biológicamente activas, sino que son hidrolizados por la enzima mirosinasa para la producción de isotiocianatos, tiocianatos, nitrilos y epinitrilos, que sí poseen actividad biológica de interés en el ser humano. Un ejemplo es la glucorafanina, el glucosinolato más importante de los brotes de brócoli, que es hidrolizado por la mirosinasa para generar sulforafano, un isotiocinato con diversas propiedades beneficiosas asociadas [1]. Por otro lado, los brotes de crucíferas se caracterizan por tener un perfil de compuestos fenólicos similar, donde destacan los ácidos fenólicos y flavonoides glicosilados [5].

La elicitación de brotes vegetales permite un aumento en la producción de metabolitos secundarios de interés, ya sean glucosinolatos o compuestos fenólicos. Hoy en día están surgiendo nuevas técnicas que permiten optimizar y mejorar la elicitación, como por ejemplo el empleo de luces LED (Diodo Emisor de Luz) para generar un estrés controlado que provoque la generación de determinados metabolitos secundarios [6]. Es por esto que se está realizando un esfuerzo en el estudio del efecto de las diferentes luces (con diferentes longitudes de onda) sobre la fisiología de la planta y la producción de compuestos bioactivos de interés [7]. Sin embargo, éste es un campo poco estudiado y muy novedoso que cuenta con numerosos factores a tener en cuenta, como la especie de cultivo, las condiciones climáticas en las que se está desarrollando, la calidad de la semilla, etc [6]. Por esta razón, es necesario profundizar en este ámbito, con el fin de conocer más sobre esta prometedora tecnología emergente y su aplicación en la elicitación de compuestos fitoquímicos en brotes vegetales comestibles.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Germinación y almacenamiento de los brotes

Las semillas de rábano (*R. sativus*) y de brócoli (*B. oleracea var. italica*) serán proporcionadas por Intersemillas S.A. (Valencia, España). Los brotes se desarrollarán de acuerdo a las condiciones de crecimiento definidas en el artículo de Baenas et al. [6]. Todas las muestras serán conservadas liofilizadas a temperatura ambiente. Los tratamientos con luces LED se realizarán en una cámara de cultivo con condiciones ambientales controladas (ciclos de día/noche, humedad y temperatura). Las luces LED y la cámara serán proporcionadas por diferentes empresas.

2.2 Extracción y análisis de los brotes

Las muestras liofilizadas serán extraídas según el método definido por Baenas et al. [2]. El análisis cromatográfico de glucosinolatos y compuestos fenólicos será llevado a cabo en un HPLC-DAD Agilent 1269 Infinity equipado con una bomba binaria (modelo G 1312 B), un desgasificador (modelo G 1379 B), un autoinyector (modelo G 131-44510) y un detector de red de diodos, DAD

(modelo G 4212 B), controlado por el software Agilent B.02. 02. La cuantificación se llevará a cabo mediante curva patrón de sinigrina y glucobrasicina a 227 nm (para glucosinolatos alifáticos e indólicos) y ácido sinápico y ferúlico a 320 y rutina a 360 nm (para flavonoides) [2].

3. RESULTADOS ESPERADOS

De los resultados a obtener se espera una mejora y potenciación en la cantidad de compuestos bioactivos de las diferentes muestras mencionadas. De igual modo, se espera obtener resultados diferentes dependiendo del tipo de luz LED empleada (longitud de onda) y del compuesto analizado.

4. CONCLUSIONES

La mejora de la cantidad de los compuestos bioactivos mediante elicitación con luces LED se podría asociar a la reacción, sobre la fisiología de la planta, de cada tipo de luz (diferentes longitudes de onda). De esta forma, este estudio podría dilucidar diferentes aspectos de una tecnología emergente que aún requiere de mucho trabajo futuro para su total entendimiento y aprovechamiento en la industria.

5. REFERENCIAS

- [1] Moreno DA, P.-B.S., García-Viguera C. 2006. Phytochemical quality and bioactivity of edible sprouts. *NPC*, 11. Pp. 1037-1048.
- [2] Baenas, N., Gómez-Jodar, I., Moreno, D.A., García-Viguera, C.; Periago, P.M. 2017. Broccoli and radish sprouts are safe and rich in bioactive phytochemicals. *Postharvest Biology and Technology*, 127. Pp. 60-67.
- [3] Baenas, N., Ferreres, F., García-Viguera, C., Moreno, D.A. 2015. Radish sprouts—Characterization and elicitation of novel varieties rich in anthocyanins. *Food Research International*, 69. Pp. 305-312.
- [4] Barba, F.J., Nikmaram, N., Roohinejad, S., Khelifa, A., Zhu, Z., Koubaa, M. 2016. Bioavailability of Glucosinolates and Their Breakdown Products: Impact of Processing. *Frontiers in nutrition*, 3. Pp. 24-24.
- [5] Francisco, M., Moreno, D.A., Cartea, M.E., Ferreres, F., García-Viguera, C., Velasco, P. 2009. Simultaneous identification of glucosinolates and phenolic compounds in a representative collection of vegetable *Brassica rapa*. *Journal of Chromatography A*, 1216. Pp. 6611-6619.
- [6] Baenas, N., Villaño, D., García-Viguera, C., Moreno, D.A. 2016. Optimizing elicitation and seed priming to enrich broccoli and radish sprouts in glucosinolates. *Food Chemistry*, 204. Pp. 314-319.
- [7] Al-Dhabi N.A., A.M., Kim S.J., RomijUddin M., Park W.T., Lee S.Y., Park S.U. 2015. Methyl Jasmonate- and Light-Induced Glucosinolate and Anthocyanin Biosynthesis in Radish Seedlings. *Natural product communications*, 10. Pp. 1211-1214.

Assessment of the feasibility of using ozone treated reclaimed salt water for citrus irrigation

Evaluación de la viabilidad del uso de agua salina regenerada tratada con ozono para el riego de cítricos

I. Gil-Fernández*, A. Pérez-Pastor

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

*ismael.gil@edu.upct.es

Abstract

The use of reclaimed water has multiple benefits and risks for crops and human health due to its low agronomic quality and presence of toxic substances. The advanced treatment with ozone can reduce the negative effects of irrigation with reclaimed water and for this reason it is necessary to study the effect of this technology on physiological and agronomical crop parameters. This study aims to optimize irrigation management with ozone treated reclaimed salt water for grapefruit crop using sensors that will provide continuous information on the quality of water used, the water status of soil and plant and soil salinization that will be correlated with multispectral and thermal sensors installed on unmanned aerial vehicles (UAVs).

Keywords: water status; salinity; treated wastewater; UAVs.

Resumen

La utilización de agua regenerada tiene múltiples beneficios y riesgos para el cultivo y para la salud humana por su baja calidad agronómica y presencia de sustancias tóxicas. El tratamiento avanzado con ozono puede disminuir los efectos negativos del riego con aguas regeneradas por lo que es necesario estudiar el efecto de esta tecnología sobre parámetros fisiológicos y agronómicos del cultivo. En este estudio se pretende optimizar el manejo del riego con agua regenerada tratada con ozono para el cultivo de pomelo utilizando sensores que suministrarán una información continua de la calidad del agua empleada, el estado hídrico del suelo y planta y la salinización del suelo que serán correlacionados con los sensores multiespectrales y térmicos instalados sobre vehículos aéreos no tripulados (UAVs).

Palabras clave: estado hídrico; salinidad; agua residual tratada; UAVs.

1. INTRODUCCIÓN

El agua es un factor clave para la salud de los seres vivos y ecosistemas, así como para el desarrollo social y económico de las regiones. Su cada vez menor disponibilidad, así como la disminución en su calidad es un problema mundial que será agravado en la próxima década debido a su escasez y contaminación. Para el año 2025 se estima que alrededor de un 60% de la población mundial tendrá que hacer frente a situaciones de escasez de agua [1]. Se estima que más del 80% del agua usada en todo el mundo, ni se recoge ni se trata por lo que es fundamental

encontrar alternativas de tratamiento de aguas residuales, fiables y eficientes, que permitan su reutilización de forma segura, especialmente en su uso agronómico.

La Región de Murcia es líder mundial en materia de tratamiento y depuración de aguas, así como del uso del agua regenerada en la agricultura que junto a la Comunidad Valencia genera la mitad del agua depurada que se usa para riego en toda España [2].

La utilización de aguas regeneradas tiene múltiples beneficios [3] como la reducción del aporte de contaminantes a los cursos naturales del agua, la mayor fiabilidad y regularidad del caudal de agua disponible y, por último, supone el aprovechamiento de los elementos nutritivos contenidos en ellas a modo de fertilizantes para los cultivos.

Por el contrario, existen riesgos para el cultivo derivados del uso de aguas regeneradas como es el aporte excesivo de nutrientes que favorece la formación de biopelículas que en instalaciones de riego puede provocar problemas de corrosión y obstrucciones. Además, la elevada presencia de microorganismos patógenos puede producir infestaciones del suelo provocando enfermedades radiculares [4,5]. Otro riesgo es la salinización a medio plazo del suelo y la presencia de iones fitotóxicos, siendo los más significativos el sodio, el boro y los cloruros [6]. La elevada concentración de sales presente en estos tipos de agua no solo merma la rentabilidad y productividad de los cultivos debido al efecto osmótico y/o tóxico de los iones salinos, reduciendo la absorción de agua y nutrientes por parte de la planta, sino que también puede intensificar la deficiencia de oxígeno en el suelo, principalmente debido al incremento de los volúmenes de agua a aplicar en estas condiciones para asegurar el correcto lavado de sales [7]. Esta disminución de oxígeno para las raíces de las plantas puede limitar su rendimiento [8].

En cuanto a los riesgos sanitarios, se pueden clasificar en dos tipos: por un lado, el riesgo microbiológico que supone la exposición más elevada a microorganismos patógenos (nematodos intestinales, *E. coli*, etc.), y, por otro lado, el riesgo por presencia de sustancias tóxicas de origen humano (antropogénicas). Uno de los riesgos sanitarios que más incertidumbre crea es la presencia de ciertos elementos traza de los denominados “Productos Farmacéuticos y de Cuidado Personal” (PFCEPs) [9].

Debido a la baja calidad agronómica de las aguas residuales y a los riesgos para la salud humana es necesario un tratamiento avanzado para poder utilizarlas. La propuesta de este proyecto será la adaptación de sistemas avanzados con ozono ya que es capaz de mejorar la calidad del efluente no solo eliminando los contaminantes recalcitrantes, difíciles de eliminar y que persisten a lo largo de los distintos tratamientos de una EDAR, sino también procurándole características beneficiosas para el correcto desarrollo del cultivo. Estudios realizados hasta la fecha sobre la ozonización, muestran su alta capacidad biocida, destruyendo tanto los microorganismos, como a la materia orgánica que le sirve de sustento. También, gracias a su gran poder oxidante, la ozonización es capaz de reducir o eliminar contaminantes indeseables como pesticidas, detergentes, fenoles, etc. e incluso se apunta su idoneidad y efectividad sobre los llamados contaminantes emergentes (PFCEPs) [10]. Otra ventaja de la ozonización es que corrige el contenido mineral del agua de riego, debido a la oxidación de elementos como el hierro, manganeso y compuestos tales como la urea, amoníaco, nitritos o cianuros entre otros. Y, por último, la capacidad de incrementar el oxígeno en el agua de riego debido a su generación residual en dicho proceso. Hay evidencias de que la aireación del suelo puede disminuir los efectos de la deficiencia de oxígeno, permitiendo una reducción del daño directo sobre las células del mesófilo y de las células epidérmicas de los tejidos de la raíz sometidos a condiciones salinas (aguas residuales) [11], permitiendo al mismo tiempo, un incremento de la difusión de dióxido de carbono y etileno desde la raíz, un aumento de la exclusión y/o acumulación de sales, así como un incremento de la respiración y crecimiento del sistema radicular [12-14].

Pese a su potencial, la tecnología de la ozonización de aguas residuales con fines agrícolas apenas ha sido desarrollada y estudiada. Por ello, resulta fundamental monitorizar el estado del

suelo, del ambiente y de las plantas. Dicha monitorización se puede conseguir, utilizando desde las tradicionales redes de sensores cableadas basadas en dataloggers, hasta la utilización de tecnologías de la información y de las comunicaciones relativamente más recientes, como son las Redes Inalámbricas de Sensores [15] (WSNs), ampliamente usadas en el marco de la denominada Agricultura de Precisión [16]. Las plataformas inalámbricas de sensores nos suministrarán una información continua de la calidad del agua empleada, el estado hídrico del suelo y planta y la salinización del suelo que serán correlacionados con los sensores multispectrales y térmicos instalados sobre vehículos aéreos no tripulados (UAVs) para poder diagnosticar rápidamente el estado hídrico del cultivo y la salinización del suelo, de forma que se puedan corregir los protocolos de riego para obtener una máxima eficiencia en el uso del riego con aguas regeneradas tratadas con ozono.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Descripción del sitio y tratamiento de riego

Para el estudio, se ha seleccionado 0,5 ha de pomelo de la variedad "Star Ruby" (*Citrus paradisi* Macf.) injertado sobre patrón *Macrophylla* (*Citrus macrophylla* Wester) situada en una finca comercial en Campotéjar-Murcia, sureste de España (38°07'16" N; 1°13'14,9" W). Se establecerán cuatro tratamientos de riego distintos con agua procedente del Trasvase Tajo-Segura (1 dS/m) y de la estación depuradora de aguas residuales EDAR de Molina Norte (3,5dS/m). Se irrigará con dos tratamientos de agua regenerada tratada y no tratada con ozono y dos tratamientos con agua del trasvase tratada y no tratada con ozono. El riego aplicado será el 100% de la evapotranspiración del cultivo (ETc). La dosis de ozono se modificará en función de la carga orgánica del agua regenerada.

2.2 Medidas continuas

Las fluctuaciones del diámetro de tronco serán medidas con sensores de desplazamiento lineal (LVDT; Solartron Metrology, Bognor Regis, UK, model DF ± 2.5 mm, precision ± 10 mm). La humedad, conductividad eléctrica y temperatura del suelo se medirá con los sensores HP-2 (HydraProbe II, Stevens, Portland, Oregon), El potencial matricial se determinará con los sensores MPS-6, denominados ahora Teros 21, (METER GROUP). Para la medición de la velocidad del flujo de savia en el xilema se utilizará el sistema de Flujo de Calor Compensado (CHP) y Gradiente Promedio (AG) del Instituto de Agricultura Sostenible (IAS). Para controlar el bulbo húmedo y las posibles pérdidas de agua por lixiviación se utilizarán los sensores de humedad 10-HS (METER GROUP). Las mediciones se tomarán cada 30 s, y las medias de 10 minutos serán registradas por un datalogger CR1000 (Campbell Scientific Inc., Logan, USA), conectado a un multiplexor AM16/32.

2.3 Medidas discretas

Se medirá de forma periódica el estado hídrico del cultivo, el intercambio gaseoso, el crecimiento vegetativo, la nutrición mineral, la producción y parámetros de calidad del fruto. Se tomarán imágenes con drones habilitados con cámara multispectral y térmica. También se medirá la aireación del suelo.

3. RESULTADOS ESPERADOS

El desarrollo de este trabajo permitirá optimizar la gestión del uso de aguas regeneradas en el riego, minimizando los efectos negativos que la baja calidad agronómica de estas aguas puede generar a nivel fisiológico y productivo. Se desarrollarán protocolos de actuación, basados en el empleo de ozono, nuevas tecnologías y sensores, que permitirán un uso eficiente del agua de riego

con aguas regeneradas. Dichos protocolos y sistemas serán testados y validados a nivel de demostración, antes de ser difundidos a los usuarios finales.

4. AGRADECIMIENTOS

Proyecto REUSAGUA. Gestión integrada de la regeneración y reutilización eficiente y segura de aguas residuales urbanas en la agricultura. Este trabajo ha sido financiado por la Consejería de Desarrollo Económico, Turismo y Empleo. Proyectos estratégicos contemplados en la Estrategia de Investigación e Innovación para la Especialización Inteligente de la Región de Murcia, RIS3Mur (2116SAE00165).

5. REFERENCIAS

- [1] Cosgrove, W.J., Rijsberman F.R., 2000. World Water Vision: Making Water Everybody's Business. London: Earthscan Publications.
- [2] Iglesias Esteban, R., Ortega de Miguel, E., 2008. Present and future of wastewater reuse in Spain. *Desalination*, 218(1-3), 105-119.
- [3] Asano, T., Burton, F.L., Leverenz, H.L., Tsuchihashi, R., Tchobanoglous, G., 2006. Agricultural irrigation with reclaimed water: on overview. In: Asano, T. (Ed.), *Water Reuse. Issues, Technologies and Applications*. Metcalf & Eddy/AECOM. McGraw Hill, New York.
- [4] Koivunen, J., Siitonen, A., Heinonen-Tanski, H., 2003. Elimination of enteric bacteria in biological-chemical wastewater treatment and tertiary filtration units. *Water Res.* 37, 690-698.
- [5] Rajala, R.L., Pulkkanen, M., Pessi, M., Heinonen-Tanski, H., 2003. Removal of microbes from municipal wastewater effluent by rapid sand filtration and subsequent UV irradiation. *Water Sci. Technol.* 47 (3), 157-162
- [6] Pedrero, F., Kalavrouziotis, I., Alarcón, J. J., Koukoulakis, P., Asano, T., 2010. Use of treated municipal wastewater in irrigated agriculture—Review of some practices in Spain and Greece. *Agr. Water Manage.*, 97(9), 1233-1241.
- [7] Assouline, S., Narkis, K., 2013. Effects of long-term irrigation with treated wastewater on the root zone environment. *Vadose Zone J.*, 12(2),0.
- [8] Poysa, V.W., Tan, C.S., Stone, J.A., 1987. Flooding stress and the root development of several tomato genotypes. *Hort Sci* 1987, 22:24-6.
- [9] Gerrity, D., Snyder, S., 2011. Review of Ozone for Water Reuse Applications: Toxicity, Regulations, and Trace Organic Contaminant Oxidation. *Ozone Sci. Eng.*, 33(4), 253-266.
- [10] Kim, I., Yamashita, N., Tanaka, H., 2009. Performance of UV and UV/H₂O₂ processes for the removal of pharmaceuticals detected in secondary effluent of a sewage treatment plant in Japan. *J. Hazard. Mater.* 166, 1134-1140.
- [11] Bhattarai, S., Pendergast, L., and Midmore, D. J. 2005a. Oxygation of subsurface drip irrigated tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) improves yield performance, tolerance to salinity and water use efficiency in normal and saline heavy clay soil. *Sci. Hortic.*
- [12] Kim, I., Yamashita, N., Tanaka, H., 2009. Performance of UV and UV/H₂O₂ processes for the removal of pharmaceuticals detected in secondary effluent of a sewage treatment plant in Japan. *J. Hazard. Mater.* 166, 1134-1140.
- [13] Bhattarai, S. P., and Midmore, D. J. 2004. Oxygation of rhizosphere with subsurface aerated irrigation water improves lint yield and performance of cotton on saline heavy clay soil. In "4th International Crop Science Congress," Brisbane, Australia.
- [14] Letey, J., 1961. Aeration, compaction and drainage. *Calif. Turf Grass Culture* 11,17-21.
- [15] Kim, I., Yamashita, N., Tanaka, H., 2009. Performance of UV and UV/H₂O₂ processes for the removal of pharmaceuticals detected in secondary effluent of a sewage treatment plant in Japan. *J. Hazard. Mater.* 166, 1134-1140.
- [16] Zhang, N., Wang, M., Wang, N., 2002. Precision agriculture—a worldwide overview. *Comput. Electron. Agric.* 36, 113-132.

Agronomic and physiological evaluation of the use of biostimulants in intensive agriculture

Evaluación agronómica y fisiológica del uso de bioestimulantes en una agricultura intensiva

S. Zapata-García^{1*}, P.J. Espinosa-Jimenez², A. Pérez-Pastor¹

¹Technical University of Cartagena, Higher Technical School of Agronomic Engineering (ETSIA), Department of Agronomical Engineering, Paseo Alfonso XII, 48, 30203, Cartagena, Murcia. Spain

²FMC Corporation, Department of Marketing, Product manager, Murcia. Spain

*susana.zapata@upct.es

Abstract

This PhD project, possible through a collaboration between the Polytechnical University of Cartagena and FMC Corporation, seeks to investigate the physiological and agronomic response involved in the use of biostimulants in agriculture, analyzing the synthesis of phytohormones, the efficient use of nutrients, their tolerance to abiotic stress and the improvement of crops' quality. The results that will be obtained are expected to justify their use and promote the development of new biostimulant products elaborated by the company itself.

Keywords: seaweed extract; PGPR; phytohormones.

Resumen

Esta propuesta de Tesis Doctoral, enmarcada en la colaboración entre la empresa FMC Corporation y la Universidad Politécnica de Cartagena suscrita a través de una Cátedra de Empresa, busca indagar sobre la respuesta fisiológica y agronómica que conlleva el uso de bioestimulantes en la agricultura, a través del análisis de la síntesis de fitohormonas, del uso eficiente de nutrientes, de su aptitud a la tolerancia a estreses abióticos y la calidad de las cosechas. Con los resultados que se obtendrán se espera justificar su uso e impulsar el desarrollo de nuevos productos bioestimulantes elaborados por la propia empresa.

Palabras clave: extractos de algas; PGPR; fitohormonas.

1. INTRODUCCIÓN

Los bioestimulantes han sido definidos por el consejo europeo para la industria de los bioestimulantes (EBIC) como “sustancias y/o microorganismos cuya función cuando se aplican a las plantas o a la rizosfera es estimular los procesos naturales para mejorar/beneficiar la absorción de nutrientes, la eficiencia de los nutrientes, la tolerancia al estrés abiótico y la calidad de los cultivos.”

Actualmente se acepta para ellos una clasificación [1], atendiendo a su composición o procedencia: i) ácidos húmicos y fúlvicos, ii) hidrolizados de proteínas y otros compuestos ricos en nitrógeno, iii) extractos de algas y plantas, iv) quitosano y otros biopolímeros derivados de la

quitina, v) compuestos inorgánicos, vi) hongos micorrícicos, vii) bacterias simbiotes, englobando a bacterias endosimbiontes y rizobacterias.

Podemos encontrar números estudios sobre los efectos beneficiosos de los bioestimulantes en distintos cultivos [2]–[6]. Sus efectos, atendiendo a nivel molecular, se llevan a cabo por la acción de pequeñas moléculas orgánicas contenidos en ellos, que regulan determinados genes de los cultivos [7], de esta forma, son capaces de regular la expresión de determinadas proteínas y hormonas [8]–[10].

En este contexto, queremos desarrollar una nueva línea de trabajo para la UPCT en colaboración con la empresa FMC, que tiene en fase de prueba multitud de nuevos compuestos bioestimulantes, englobados principalmente en las categorías iii y vii mencionadas anteriormente. De esta forma, se ensayarán nuevas formulaciones (no descritas en la bibliografía hasta el momento), a nivel de laboratorio y en fincas comerciales, obteniendo de esta colaboración conocimiento beneficioso para ambas partes.

El principal objetivo de la propuesta de Tesis Doctoral es la justificación del uso de bioestimulantes en la agricultura y la búsqueda de las causas por las que su uso optimizaría la respuesta agronómica y fisiológica de los cultivos a través del uso eficiente de nutrientes, su aptitud a la tolerancia a estreses bióticos y la calidad de las cosechas. De esta forma, los resultados obtenidos podrían beneficiar el futuro desarrollo de nuevos productos bioestimulantes elaborados por la propia empresa. Para ello se estudiará la respuesta agronómica y fisiológica de los cultivos ante la aplicación de bioestimulantes, analizando tras ella la eficiencia en el uso de nutrientes y la implicación de diferentes fitohormonas en esta respuesta. En una segunda fase, se estudiará la tolerancia de los cultivos bioestimulados ante períodos de estreses hídricos y salinos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

Se realizarán dos tipos de ensayos, unos de corta duración, utilizando para ello cámaras de cultivo localizadas en las instalaciones de la Universidad Politécnica de Cartagena. Estos ensayos se realizarán únicamente en cultivo hortícola.

El segundo tipo de ensayos se desarrollarán en campo, localizados en distintas explotaciones comerciales, ubicadas principalmente en el sureste peninsular. Estos ensayos comprenderán distintos tipos de cultivos, tanto hortícolas como leñosos.

2.2 Análisis químico de bioestimulantes

Se analizará el contenido en sólidos totales, proteínas, polifenoles, azúcares totales y determinadas moléculas que son utilizadas como estándar para su comercialización o las unidades formadoras de colonias que los componen, en el caso de aquellos bioestimulantes formulados con microorganismos. También se medirá el contenido hormonal de los mismos.

2.3 Medidas a realizar sobre las plantas

Se realizará un análisis químico y nutricional en los distintos órganos vegetales. En las hojas además se medirá el contenido hormonal y posteriormente un estudio de la expresión de genes relacionados con este aumento.

Se realizarán medidas del crecimiento vegetativo, de fotosíntesis y del estado hídrico de la planta. En aquellos ensayos que lo permitan también se evaluará la cantidad y calidad de la cosecha.

En el suelo se medirá la respiración (emisión de CO₂ del mismo) y su composición del suelo en la zona de mayor densidad radicular.

3. RESULTADOS ESPERADOS

Tras la aplicación de los bioestimulantes se espera encontrar en las plantas analizadas una mejora de los parámetros fotosintéticos, acompañado de un aumento de la producción y calidad de los cultivos, así como en el contenido nutricional de la planta. Se espera observar una correlación en la respuesta hormonal de la planta con las concentraciones obtenidas en el análisis de los extractos bioestimulantes que se le apliquen.

4. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se encuentra financiada por la cátedra de empresa FMC-UPCT. Quería agradecer a mis directores, Alejandro Pérez Pastor y Pedro J. Espinosa por su ayuda en la planificación y las ideas aportadas para que esta investigación sea posible, y a mis compañeros del laboratorio, por el apoyo en los largos días.

5. REFERENCIAS

- [1] du Jardin P. 2015. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Sci. Hortic.* 196: 3–14.
- [2] Singh M., Singh D., Gupta A., D. Pandey K., K. Singh P., Kumar A. 2019. Chapter Three - Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Application in Biofertilizers and Biocontrol of Phytopathogens. In: *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture*, A. K. Singh, A. Kumar, and P. K. Singh, eds. Woodhead Publishing. Pp. 41–66.
- [3] Goñi O., Quille P., O'Connell S. 2018. *Ascophyllum nodosum* extract biostimulants and their role in enhancing tolerance to drought stress in tomato plants. *Plant Physiol. Biochem.* 126: 63–73.
- [4] Sangha J.S., Kelloway S., Critchley A. T., Prithiviraj B. 2014. Chapter Seven - Seaweeds (Macroalgae) and Their Extracts as Contributors of Plant Productivity and Quality: The Current Status of Our Understanding. In: *Advances in Botanical Research*, N. Bourgougnon, eds. Academic Press. Pp. 189–219.
- [5] Zhao H., Shao D., Jiang C., Shi J., Li Q., Huang Q., Rajoka M.S.R., Yang H., Jin M. 2017. Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101: 5951–5960.
- [6] R. Lopes R., Tsui S., Gonçalves P.J.R.O., de Queiroz M.V. 2018. A look into a multifunctional toolbox: endophytic *Bacillus* species provide broad and underexploited benefits for plants, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 34: 94.
- [7] Craigie J.S. 2011. Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture, *J. Appl. Phycol.* 23: 371–393.
- [8] Santaniello A., Scartazza A. Gresta F., Loreti E., Biasone A., Di Tommaso D., Piaggese A., Perata P. 2017. *Ascophyllum nodosum* Seaweed Extract Alleviates Drought Stress in *Arabidopsis* by Affecting Photosynthetic Performance and Related Gene Expression. *Front. Plant Sci.* 8: 1362.
- [9] Rensink W.A., Buell C. R. 2005. Microarray expression profiling resources for plant genomics, *Trends Plant Sci.* 10: 603–609.
- [10] Goñi O., Fort A., Quille P., McKeown P. C., Spillane C., O'Connell S. 2016. Comparative Transcriptome Analysis of Two *Ascophyllum nodosum* Extract Biostimulants: Same Seaweed but Different, *J. Agric. Food Chem.* 64: 2980–2989.

Alternatives of preservation and processing to maintain the nutritional properties of broccoli

Alternativas de conservación y procesado para mantener las propiedades nutricionales del brócoli

E. Paulsen^{1*}, P. Lema¹, D.A. Moreno², P.S. Fernández³

¹Instituto de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, UdelaR. Uruguay

²Laboratorio de Fitoquímica y Alimentos Saludables, Dpto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, CEBAS-CSIC. Spain

³Departamento de Ingeniería Agronómica, ETSIA, UPCT. Spain

*erikap@fing.edu.uy

Abstract

The increase of noncommunicable diseases is mainly attributed to poor diet. Consumers are being more awareness about it, demanding healthier and more convenient foods. In this context, this work proposes to study the effect of preservation and processing technologies on parameters of nutritional quality of ready-to-eat broccoli florets. Modified atmosphere packaging (MAP) is a technology widely used to preserve fresh and ready-to-eat horticultural products. It is proposed to study the effect of different MAP parameters on the profile and evolution of nutritional compounds of ready-to-eat broccoli florets during storage. Additionally, other quality parameters and shelf life of the product will be evaluated. On the other hand, cooking processes previously applied to broccoli consumption affect their nutritional value. In this study an evaluation of the effect of different cooking methods on the conservation of nutritional compounds of broccoli florets will be carried out.

Keywords: minimally processed; modified atmosphere packaging; cooking methods; health promoting.

Resumen

El incremento de enfermedades no transmisibles se atribuye principalmente a una mala alimentación. Un aumento en la concientización por parte de los consumidores ha aumentado la demanda de alimentos más saludables y convenientes. Este trabajo propone estudiar el efecto de tecnologías de conservación y procesado en parámetros de calidad nutricional de floretes de brócoli listos para consumir. El envasado en atmósfera modificada (MAP) es una tecnología ampliamente utilizada para la preservación de productos hortofrutícolas frescos y listos para consumir. Se propone estudiar el efecto de distintos parámetros de esta tecnología sobre el perfil y evolución de componentes de interés nutricional de floretes de brócoli listos para el consumo. Así como la degradación de estos componentes durante el almacenamiento del producto y realizar seguimiento de otros parámetros de calidad durante su vida útil. Otro aspecto importante son los métodos de preparación del brócoli previo a su consumo, los cuales inciden en la calidad nutricional. Por lo tanto, el estudio se complementará con una evaluación de los efectos de distintos métodos de cocinado en la conservación de los compuestos de interés nutricional.

Palabras clave: mínimamente procesado; envasado en atmósfera modificada; métodos de cocinado; compuestos promotores de la salud.

1. INTRODUCCIÓN

El brócoli es un vegetal del género *Brassica* altamente valorado debido a su importante contenido de vitaminas, antioxidantes y fitoquímicos promotores de la salud [1, 2]. Varios estudios epidemiológicos muestran una relación inversa entre el consumo de este tipo de vegetales y el riesgo a contraer cáncer y otro tipo de enfermedades no transmisibles. El efecto protector de estos vegetales se atribuye a la gran cantidad de componentes fitoquímicos que poseen, y especialmente a su alto contenido de glucosinolatos (GLSs) [3]. En los últimos años, estos compuestos han ganado especial atención debido a su comprobada actividad anticancerígena [1, 4]. A pesar de la extensa literatura sobre los GLSs, aún existe información contradictoria sobre los efectos que tienen las tecnologías de conservación y procesado sobre estos compuestos [5].

La aplicación de envasado en atmósfera modificada (MAP) ha demostrado ser una tecnología capaz de extender la vida útil de frutas y hortalizas cuando se diseña correctamente, y en la actualidad es utilizada ampliamente en la comercialización de este tipo de productos [6]. Existen varios estudios que reportan un efecto significativo de la modificación atmosférica sobre el contenido de GLSs. Sin embargo, aún se desconoce cómo la concentración de O₂ y/o CO₂ afecta en el contenido de estos compuestos en brócoli. Rangkadilok et al. (2002) [7] observaron que la retención de glucorafanina en muestras de brócoli almacenadas 10 días a 20°C era mayor cuando se aplicaba MAP (1,5% de O₂ y 6% de CO₂) que cuando se dejaban expuestos al aire. Otros autores, reportaron que floretes de brócoli en atmósferas modificadas activas (10% de O₂ y 5% de CO₂) a 5°C y durante 12 días conservaban en mayor medida GLSs, y polifenoles totales respecto a floretes sin envasar [8]. Algunos trabajos indican que la modificación de la atmósfera incrementa el contenido de GLSs a lo largo del almacenamiento, y lo atribuyen a una respuesta al estrés [8].

Por otra parte, es necesario determinar el impacto de los procesos de cocinado en los compuestos bioactivos del producto tal cual será consumido. Es bien sabido que los métodos de cocinado inducen importantes cambios en la composición química y física, y por lo tanto influyen en la concentración y biodisponibilidad de los componentes de interés nutricional. Los métodos más usuales para la cocción de brócoli son hervido, escaldado, vapor, frito/salteado, horno convencional y horno microondas. En la literatura se encuentran varios trabajos que evalúan el efecto de estos métodos en el contenido de GLSs, polifenoles y vitamina C en brócoli. Sin embargo, la comparación entre estudios resulta difícil debido a que dentro de un mismo método son varios los parámetros que se pueden cambiar. En general, la cocción al vapor es el método que ha demostrado conservar mejor los GLSs. Los datos indican pérdidas de entre un 15-40%, dependiendo de las condiciones [9]. Incluso algunos autores han señalado un aumento en el contenido de GLSs después de la cocción al vapor [10]. El hervido es el método que ha mostrado ser más agresivo respecto a la pérdida de GLSs, principalmente por el efecto de la lixiviación, reportándose pérdidas de entre 40-77% [9]. Respecto al efecto del cocinado de brócoli al microondas, los resultados son diversos. Algunos autores muestran pérdidas drásticas de GLSs, mientras que otros reportan un aumento en el contenido de estos compuestos [9, 11]. Las discrepancias entre los estudios se pueden explicar por las condiciones de extracción empleadas para los análisis y por las condiciones de cocción que varían ampliamente. Esto hace que sea difícil determinar los efectos positivos y negativos de este método de cocinado [11].

En base a lo mencionado, el objetivo principal del proyecto es estudiar cómo influyen las condiciones de conservación, almacenamiento y cocinado para seleccionar aquellas que permitan mantener las propiedades nutricionales de floretes de brócoli.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizarán ensayos de floretes de brócoli MAP evaluando el efecto de diferentes parámetros: temperatura de almacenamiento, permeabilidad de films, composición atmosférica inicial, en el perfil y contenido de compuestos bioactivos y calidad fisicoquímica y microbiológica del vegetal.

Se llevarán a cabo experiencias de cocinado de los floretes mediante diferentes métodos, vapor y microondas principalmente, evaluando el impacto en el perfil y contenido de compuestos bioactivos y calidad microbiológica. Estas experiencias se realizarán en el marco de la Unidad Asociada de Calidad y Evaluación de Riesgo de Alimentos UPCT + CEBAS-CSIC.

La identificación y cuantificación de compuestos bioactivos, principalmente GLSs y compuestos fenólicos, se realizarán mediante técnicas analíticas de HPLC-DAD y HPLC-MS/MS [12,13]. También se evaluará la capacidad antioxidante a través de análisis espectrofotométricos [14].

Se realizará el seguimiento de otros parámetros de calidad durante el almacenamiento: pérdida de peso, composición atmosférica dentro de envases, color y textura instrumental, recuento microbiano y otros que resulten relevantes [15].

3. RESULTADOS ESPERADOS

Este proyecto pretende generar resultados que permitan la selección objetiva de condiciones de envasado, almacenamiento y cocinado que preserven los componentes bioactivos y actividad biológica del brócoli, y en consecuencia su potencial saludable.

Como resultados principales, se espera identificar parámetros de la tecnología de MAP que tengan un efecto significativo en el contenido de compuestos bioactivos y en la calidad fisicoquímica y microbiológica de floretes de brócoli listos para consumir. Además, se espera cuantificar la pérdida de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante asociada a la aplicación de MAP durante el almacenamiento del producto.

Por otra parte, se espera determinar el impacto de diferentes metodologías de cocción sobre el valor nutricional y calidad microbiológica de floretes de brócoli.

4. CONCLUSIONES

Debido al interés en mejorar los componentes de la dieta y a la creciente demanda de productos mínimamente procesados, estudios para el desarrollo de productos hortofrutícolas frescos evaluando las condiciones que mejor conserven las cualidades nutricionales son necesarios. Por otro lado, el efecto de los métodos de cocinado sobre la calidad nutricional merece una investigación paralela más exhaustiva.

Como conclusiones del presente proyecto, se espera obtener condiciones de envasado, almacenamiento y cocinado que aseguren la retención de la calidad nutricional del brócoli. Dichas conclusiones podrán ser transferidas directamente al sector agroindustrial aportando información relevante para la elaboración de productos hortofrutícolas de alta calidad nutricional y con agregado de valor.

5. AGRADECIMIENTOS

Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por la beca doctoral otorgada a Erika Paulsen en el marco del programa EMHE, proyecto POS_EMHE_2018_1_1007740. A la ETSIA-UPCT por la admisión de Erika Paulsen al programa de doctorado TAIDA en régimen de cotutela.

6. REFERENCIAS

- [1] Jia, C., Xu, C., Wei, J., Yuan, J., Yuan, G., Wang, B., & Wang, Q. (2009). Effect of modified atmosphere packaging on visual quality and glucosinolates of broccoli florets, *Food Chemistry*, 114, 28–37.
- [2] Moreno, D. A., Carvajal, M., & García-Viguera, C. (2006). Chemical and biological characterization of nutraceutical compounds of broccoli. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1508–1522.
- [3] Nugraheidi, P. Y., Verkerk, R., Widianarko, B., Dekker, M. (2015). A Mechanistic Perspective on Process-Induced Changes in Glucosinolate Content in Brassica Vegetables: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55: 823 – 838.
- [4] Dominguez-Perles, R., Medina, S., Moreno, D. Á., García-Viguera, C., Ferreres, F., & Gil-Izquierdo, Á. (2014). A new ultra-rapid UHPLC / MS / MS method for assessing glucoraphanin and sulforaphane bioavailability in human urine. *Food Chemistry*, 143, 132–138.
- [5] Campos, D., Aguilar-Galvez, A., García-Ríos, D., Chirinos, R., Limaymanta, E., Pedreschi, R. (2019). Postharvest storage and cooking techniques affect the stability of glucosinolates and myrosinase activity of Andean mashua tubers (*Tropaeolum tuberosum*). *International Journal of Food Science and Technology*.
- [6] Belay, Z. A., Caleb, O. J., Opara, U. L. (2016). Modelling approaches for designing and evaluating the performance of modified atmosphere packaging (MAP) systems for fresh produce: A review. *Food Packaging and Shelf Life*, 6, 7-20.
- [7] Rangkadilok, N., Tomkins, B., Nicolas, M. E., Premier, R. R., Bennett, R. N., Eagling, D. R., Taylor P. W. J. (2002). The effect of post-harvest and packaging treatments on glucoraphanin concentration in Broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7386-7391.
- [8] Fernández-León, M. F., Fernández-León, A. M., Lozano, M., Ayuso, M. C., Amodio, M. L., & Colelli, G. (2013). Retention of quality and functional values of broccoli “Parthenon” stored in modified atmosphere packaging. *Food Control*, 31(2), 302–313.
- [9] Soares, A., Carrascosa, C., Raposo, A. (2017). Influence of Different Cooking Methods on the Concentration of Glucosinolates and Vitamin C in Broccoli. *Food Bioprocess Technol*, 10, 1387–1411.
- [10] Verkerk, R., Knol, J. J., & Dekker, M. (2010). The effect of steaming on the glucosinolate content in broccoli. *Acta Horticulturae*, 867, 37–45.
- [11] Barakat, H., & Rohn, S. (2014). Effect of different cooking methods on bioactive compounds in vegetarian, broccoli-based bars. *Journal of Functional Foods*, 11, 407–416.
- [12] Pérez-Balibrea, S., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2008). Influence of light on health-promoting phytochemicals of broccoli sprouts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(5), 904–910.
- [13] Francisco, M., Moreno, D.A., Cartea, M.E., Ferreres, F., Garcia-Viguera, C., Velasco, P. (2009). Simultaneous identification of glucosinolates and phenolic compounds in a representative collection of vegetable *Brassica rapa*. *J. Chromatogr. A* 18 (38), 6611–6619.
- [14] Pérez-Balibrea, S., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2011). Genotypic effects on the phytochemical quality of seeds and sprouts from commercial broccoli cultivars. *Food Chemistry*, 125, 348–354.
- [15] Paulsen, E., Barrios, S., Baenas, N., Moreno, D. A., Heinzen, H. & Lema, P. (2018). Effect of temperature on glucosinolates content and shelf life of ready-to-eat broccoli florets packaged in passive modified atmosphere. *Postharvest Biology and Technology*, 138, 125-133.

The importance of native microbial communities in the sustainability of vegetation for the phytomanagement of semiarid mine tailings

Importancia de las comunidades microbianas autóctonas en la sostenibilidad de la vegetación para el fitomanejo de zonas mineras semi-áridas

Y. Risueño-García^{1*}, C. Petri-Serrano², H.M. Conesa-Alcaraz¹

¹Departamento de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena. Spain

²IHSM-CSIC La Mayora, Departamento de Fruticultura Subtropical y Mediterránea. Avenida Dr. Wienberg, s/n. 29750 Algarrobo-Costa, Málaga. Spain

*yolanda.risueno@upct.es

Abstract

This proposal of PhD thesis will focus on proposing suitable scientific and technical alternatives for the phytomanagement of metal(loid) enriched mine tailings in the Sierra of Cartagena-La Unión (SE Spain). Thus, a strategy for the environmental restoration at middle-long term will be implemented. The main goal of the project is to evaluate the effects of the addition of organic amendments (combination compost/biochar) and/or of plant growth on the structure of native microbial communities and the improvement of edaphic parameters for the phytomanagement of mine tailings in semiarid areas. The enhancement of soil functionality will be assessed attending to microbiological changes, including the structure of microbial populations and the behaviour of pioneer plant species (plant biomass, metal uptake).

Keywords: metal(loid); microorganisms; ecological succession; soil amendments.

Resumen

La presente propuesta de tesis doctoral busca aportar soluciones científico-técnicas para el fitomanejo de residuos mineros en la Sierra de Cartagena-La Unión, como parte de una estrategia de restauración ambiental sostenible a largo plazo. El objetivo general de la tesis doctoral es valorar en qué medida la adición de enmiendas orgánicas (combinación compost/biochar) y/o establecimiento de plantas pueden afectar a la estructura de las comunidades microbianas autóctonas y desencadenar procesos de evolución edáfica que redunden en la mejora de la funcionalidad del suelo desde el punto de vista microbiológico, incidiendo en aspectos relacionados con los cambios en la microbiología del suelo y el comportamiento de especies vegetales autóctonas (biomasa, acumulación de metales) dentro del contexto del fitomanejo de residuos mineros en zonas semiáridas.

Palabras clave: metales; microorganismos; sucesión ecológica; enmiendas edáficas.

1. INTRODUCTION

Mine tailings cause the main environmental impacts in former metal ore mining areas [1]. The extreme physico-chemical properties of tailings such as contrasting pH values, high salinity, high metal(loid) concentrations, low fertility, etc. lead to the occurrence of bare surfaces prompt for erosion [1]. Previous findings in semiarid tailings have highlighted the use of pioneer plant species combined with amendments (phytomanagement by phytostabilization) as the best tool to perform their surface stabilization [2, 3]. The goal in these sites should focus in improving soil functionality and the sustainability of the nutrient biogeochemical cycles over time, which could lead to generate a self-sustaining vegetation cover [4]. In this process, native microbial communities play an important role by supporting the cycling of nutrients, preventing plants from metal phytotoxicity or promoting plant ecological succession [5].

Based on these previous issues, and taking as a study site a former tailings disposal area of the semiarid Cartagena-La Unión Mining District, the following goals are proposed: 1) to evaluate the changes of the native microbial community generated by the existence of edaphic gradients in mine tailings; 2) to evaluate the effects of the addition of organic amendments and / or plant growth in the structure of the native microbial community; 3) to evaluate the sustainability of the microbial communities present in the tailings and their capacity to carry out the transition from systems conditioned by the addition of organic amendments to those sustained by their own leaf litter; 4) to evaluate the effect of amendments on the behavior of the native plant species and its relation with the microbiology of the mine tailings.

2. MATERIAL AND METHODS

The PhD thesis is divided in two phases:

2.1 Field phase

In this part, a transect sampling will be performed from an unpolluted area (taken as a *control*) to the mine tailings pile's plateau, distinguishing several microenvironments for soil sampling (fig 1). In each microenvironment at least three composite samples will be taken for physico-chemical analyses (*e.g.* metal(loid) concentration, pH, electrical conductivity, total nitrogen, etc.) and for the characterization of the microbial DNA by isolation and amplification with specific primers to ITS (Internal Transcribed Spacer) or rRNA16S for fungi or prokaryotes, respectively. These results of PCR will be analyzed by massive sequencing and the sequences obtained will be studied by bioinformatics and statistical programs such as CANOCO and SPSS.

2.2 Experimental phase

In this experiment the effect of the combination of amendments/plant establishment on microbial communities will be evaluated. Soil from tailings of the field phase will be used. Tailings soil will be mixed with 4% compost, 4% biochar and with a mixture of 4% compost and 4% biochar, obtaining three treatments along with a series of bulk tailings treatment (no amended). Soil from each pot (12 repetitions by each treatment) will be characterized at the beginning as it was performed for field samples (paragraph 2.1). This experiment will be developed in a controlled growth chamber (temperature, light). Pots will be maintained at half of field capacity and the physico-chemical and microbial DNA will be monitored periodically. At the sixth month, each treatment (12 pots) will be sub-divided in three groups (4 pots for each one): a group with no plant, another group will be implanted with seeds of *Piptatherum miliaceum* (a pioneer plant species from the tailings) and, in the last one, leaf litter of *P. miliaceum* will be incorporated. The experiment will continue for 12 more months and characterization of plants (biomass and ionic analyses), edaphic parameters and microbial DNA will be carried out at the end.

3. EXPECTED RESULTS

Preliminary results have been obtained at the field sampling phase. All soil samples showed alkaline pH (7.2-7.9), even so, the samples at the tailings showed deficient conditions for plant growth: low organic carbon (~0.4%) and total nitrogen (~0.05%), high electrical conductivity (2-3 dS m⁻¹ in 1:5 soil:water extract) and high metal(loid) concentrations (*e.g.* 6000 mg kg⁻¹Pb; 9000 mg kg⁻¹ Zn). Areas closed to the tailings, (external border at fig.1) showed similar metal(loid) concentrations than the tailings' pile samples. Although the most abundance bacterial phyla were *Actinobacteria*, *Proteobacteria* and *Acidobacteria* in all sampling zones (more than 50% of total abundance) (Table 1), a shift in relative abundances occurred between areas. The phylum *Actinobacteria* showed higher relative abundance in the non-vegetated samples at the tailings (*Bulk* and *Internal Border*) than at the forest samples, which could be explained by its oligotrophic character [6]. In the case of the phylum *Proteobacteria*, tailings samples showed higher percentages of abundance than samples out of the tailings. This phylum has been shown to be metal tolerant and one of the most abundant phyla in metal enriched tailings worldwide [7]. Probably because of alkaline conditions, the phylum *Acidobacteria*, was not predominant at the tailings samples. This phylum usually appears as dominant in strongly acid tailing wastes worldwide [8]. Other bacterial phylum, such as *Planctomycetes*, *Bacteroidetes* and *Verrucomicrobia*, showed relative abundances lower than 14%.

4. CONCLUSIONS

The initial data showed a closer relationship of the microbial population structure with the edaphic parameters than with the concentration of metals, indicating a tolerance behavior of some phylum for the latter. In addition, the changes in the microbial communities were also related to the presence or absence of vegetation. For instance, the phylum *Proteobacteria* seemed to play an important role in the early plant successional establishment at the tailings, which was at the same time facilitated by the absence of acidic conditions.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support for this research was provided by FEDER/Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades – Agencia Estatal de Investigación-Project CGL2017-82264-R. We acknowledge N. Andreu Somavilla and J. Ponomarenko from CGR by their help in data processing. We also acknowledge Julia Muñoz Fructuoso from IBV-UPCT for her help and assistance in lab analytical procedures.

6. REFERENCES

- [1] Mendez M.O., Maier R.M. 2008. Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments - An emerging remediation technology. *Environ. Health. Persp.* 116: 278-283.
- [2] Conesa H.M., Faz Á., Arnaldos R. 2006. Heavy metal accumulation and tolerance in plants from mine tailings of the semiarid Cartagena-La Unión mining district (SE Spain). *Sci. Total. Environ.* 366: 1-11.
- [3] 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.
- [4] Parraga-Aguado I., Querejeta J.I., González-Alcaraz M.N., Jiménez-Cárceles F.J., Conesa H.M. 2014. Usefulness of pioneer vegetation for the phytomanagement of metal(loid)s enriched tailings: Grasses vs. shrubs vs. trees. *J. Environ. Manage.* 133: 51-58.
- [5] Huang L., Baumgartl T., Mulligan D. 2012. Is rhizosphere remediation sufficient for sustainable revegetation of mine

tailings?. *Ann. Bot-London* 110:223–238.

[6] Sun X., Zhou Y., Tan Y., Wu Z., Lu P., Zhang G., Yu F. 2018. Restoration with pioneer plants changes soil properties and remodels the diversity and structure of bacterial communities in rhizosphere and bulk soil of copper mine tailings in Jiangxi Province, China. *Environ. Sci. Pollut. R.* 25:22106-22119.

[7] Chen Y.Q., Ren G.J., An S.Q., Sun Q.Y., Liu C.H., Shuang J.L. 2008. Changes of bacterial community structure in copper mine tailings after colonization of reed (*Phragmites australis*). *Pedosphere* 18:731-740.

[8] Sun W., Xiao E., Krumins V., Dong Y., Li B., Deng J., Wang Q., Xiao T. 2019. Comparative analyses of the microbial communities inhabiting coal mining waste dump and an adjacent acid mine drainage creek. *Microb. Ecol.* 1-14.

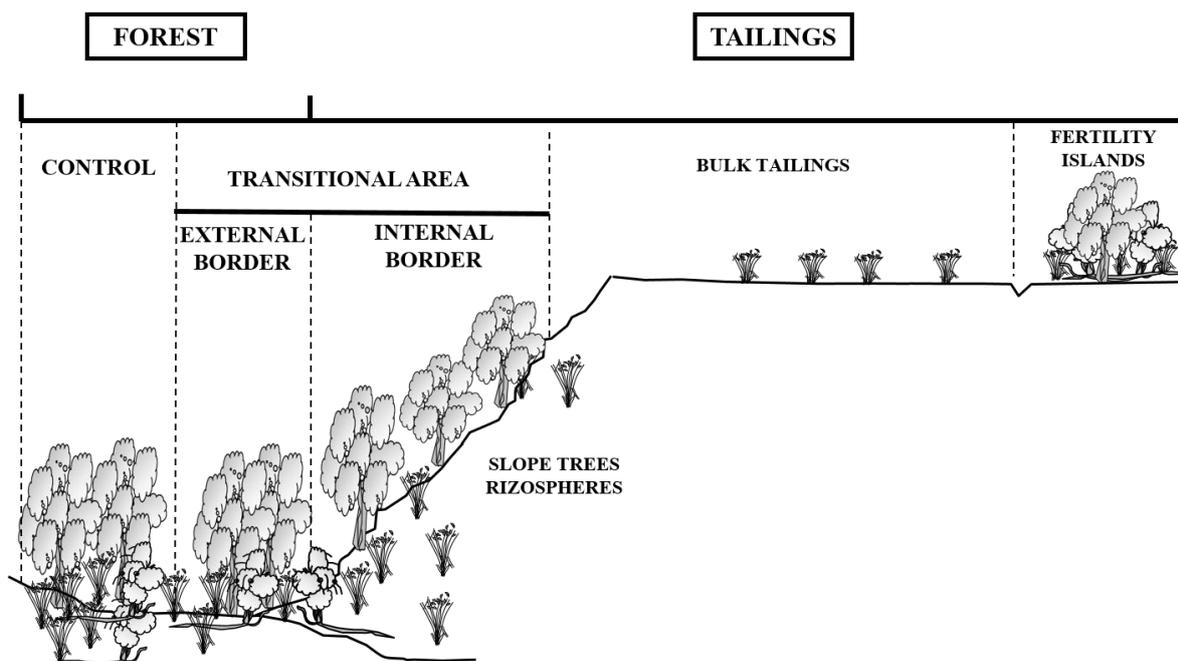


Figure 1. Scheme of the sampling transect.

Table 1. Abundance relative for transect microenvironments. Data are average \pm standard error. Different letters among columns of the same row indicate significant differences (ANOVA with Tukey's test, $p < 0.05$). Number of replicates are 3 or 6.

Bacterial Phylum	Mean Relative Abundance (%)						
	Forest			Tailing			
	Control	External Border	Internal Border	Slope Trees Rhizospheres	Bulk Tailing	Fertility Island	
<i>Acidobacteria</i>	15.8 \pm 1.0 b	17.0 \pm 0.2 b	10.1 \pm 1.2 a	10.9 \pm 0.9 a	8.9 \pm 0.6 a	10.6 \pm 0.9 a	
<i>Actinobacteria</i>	23.4 \pm 1.3 ab	17.3 \pm 0.1 a	38.6 \pm 3.0 cd	26.7 \pm 1.3 b	42.9 \pm 1.9 d	29.8 \pm 3.6 bc	
<i>Bacteroidetes</i>	7.8 \pm 0.6 bc	11.3 \pm 1.1 c	2.6 \pm 0.6 a	10.8 \pm 1.4 c	3.6 \pm 0.3 ab	8.3 \pm 0.5 c	
<i>Candidatus Saccharibacteria</i>	1.6 \pm 0.1 ab	3.1 \pm 0.3 b	0.9 \pm 0.1 a	5.4 \pm 0.3 c	2.9 \pm 0.6 b	3.3 \pm 0.4 b	
<i>Chloroflexi</i>	2.0 \pm 0.2 ab	1.2 \pm <0.1 a	2.4 \pm 0.3 b	1.7 \pm 0.2 ab	1.6 \pm 0.1 ab	2.3 \pm 0.4 b	
<i>Gemmatimonadetes</i>	3.3 \pm 0.5 a	2.9 \pm 0.1 a	8.8 \pm 0.4 b	3.9 \pm 0.5 a	3.6 \pm 1.1 a	4.3 \pm 0.6 a	
<i>Planctomycetes</i>	13.2 \pm 0.7 c	12.8 \pm 1.0 bc	5.3 \pm 1.2 a	6.5 \pm 1.1 a	4.5 \pm 0.3 a	8.7 \pm 1.4 ab	
<i>Proteobacteria</i>	16.8 \pm 0.2 a	19.7 \pm 0.3 a	28.7 \pm 0.6 b	26.1 \pm 1.4 b	29.0 \pm 1.3 b	26.7 \pm 1.9 b	
<i>Verrucomicrobia</i>	6.4 \pm 0.4 c	6.1 \pm 0.4 c	1.0 \pm 0.3 a	4.0 \pm 0.5 b	1.3 \pm 0.2 a	2.7 \pm 0.2 ab	
Others	9.8 \pm 0.6 b	8.6 \pm 0.3 b	1.8 \pm 0.2 a	4.0 \pm 0.8 a	1.7 \pm 0.5 a	3.3 \pm 0.2 a	

Design, development and validation of an intelligent system of a decision support system about irrigation water management in agriculture

Diseño, desarrollo y validación de un sistema inteligente de toma de decisiones en el manejo del agua de riego en agricultura

M. Forcén^{1*}, J.A. López², N. Pavón³, A. Pérez¹

¹Departamento de Ingeniería Agronómica, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII 48, 30203, Cartagena. Murcia. Spain

²Departamento de Tecnología Electrónica, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial, Universidad Politécnica de Cartagena. Campus Muralla del Mar, Calle Doctor Fleming S/N, 30203, Cartagena. Murcia. Spain

³Departamento de Automática, Ingeniería Eléctrica y Tecnología Electrónica, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial, Universidad Politécnica de Cartagena. Campus Muralla del Mar, Calle Doctor Fleming S/N, 30203, Cartagena. Murcia. Spain

*manuel.forcen@edu.upct.es

Abstract

This document gives an overview of the state of the art of artificial intelligence applied to precision agriculture. In addition, it describes the proposed work schedule in order to achieve the one of the objectives related to the efficient water management in agriculture that are aimed within this PhD and shows some of the advances that are fulfilled until now.

Keywords: artificial intelligence; precision farming; computer vision.

Resumen

Este documento muestra una visión general del estado del arte de la inteligencia artificial aplicada a la agricultura de precisión. Además, describe el plan de trabajo propuesto para conseguir uno de los objetivos relacionados con el manejo eficiente del agua en la agricultura que pretenden ser abordados en la tesis doctoral y muestra algunos de los avances conseguidos hasta ahora.

Palabras clave: inteligencia artificial; agricultura de precisión; visión artificial.

1. INTRODUCCIÓN

La agricultura es el mayor consumidor de agua, con alrededor del 70% del agua utilizada para el riego. También es considerada una fuente clave de contaminación difusa por la aplicación de nutrientes de forma ineficiente.

Para ser más eficientes, se ha intentado llevar técnicas como el análisis de datos y la inteligencia artificial al campo de la agricultura de precisión.

A lo largo de los años, diversos estudios han intentado aplicar distintas técnicas para mejorar algunos aspectos de los cultivos. Algunos de los trabajos más destacados son los

destinados a predecir [1], [2], a detectar [3], [4] y a ayudar en la toma de decisiones ofreciendo información que de otra manera sería costosa [5] y menos sostenible.

Cabe destacar que en los últimos años se ha visto un incremento en la cantidad de artículos y trabajos que han sido desarrollados utilizando un enfoque basado en la inteligencia artificial aplicada a agricultura de precisión, especialmente en redes neuronales artificiales, tal y como se muestra en el estudio de Kamilaris y Prenafeta-Boldú [6]. Esto es un indicativo de que se utilizan cada vez de manera más generalizada técnicas de macrodatos, análisis automático e inteligencia artificial.

Sin embargo, el aspecto sobre el que más hincapié se va a hacer a lo largo de esta tesis doctoral será cómo se usan los sistemas aéreos autónomos (drones) para extraer información útil para su análisis y su posterior uso a la hora de realizar predicciones de productividad o requerimientos hídricos y de abono, tal y como se muestra en el trabajo de Martín Abadi [7].

Algunas de las técnicas empleadas consisten en el uso de cámaras hiperespectrales y multiespectrales, con las que se consiguen obtener la cantidad de luz reflejada por las plantas en longitudes de onda distintas a la de la luz visible, con lo que se puede extraer información útil. También se utilizan cámaras térmicas para obtener valores como la temperatura de la canopia, o cámaras de luz visible para realizar inspección visual.

Por último, cabe destacar que la aplicación de técnicas de inteligencia artificial es capaz de dar un segundo significado a las clásicas imágenes de luz visible, con lo que es interesante revisar qué información es capaz de extraer un sistema de aprendizaje automático a partir de sistemas de obtención de datos tradicionales.

Como parte de este trabajo, se ha desarrollado una técnica que permite utilizar una cámara clásica para realizar una estimación de la carga productiva en un cultivo de cítricos en condiciones de campo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El proceso seguido para el desarrollo de la técnica se detalla a continuación, indicando todos los pasos

2.1 Conjunto de datos

Es la base de las redes neuronales. Permite que la misma arquitectura matemática se especialice en las tareas que se requiere. Para la particularización de esta red neuronal se utilizaron fotografías de limoneros de la Vía Verde del Noroeste (38°02'22.0"N 1°28'04.6"O).

2.2 Preprocesado, clasificación y aumentado de datos

Para la clasificación, se dividen las imágenes tomadas en teselas, que se clasifican manualmente. El tratamiento de imágenes se realiza usando el lenguaje de programación *Python*. Una vez clasificadas estas, se le aplican operaciones de tratamiento de imágenes, como rotaciones, simetrías entre otros.

2.3 Métodos

Se utiliza la librería *TensorFlow* [8], que facilita la implementación matemática de la red neuronal. Tanto para el entrenamiento como para la predicción, se utiliza la aceleración de cálculos mediante el uso de GPU ofrecido por *TensorFlow* sobre *CUDA*, para tarjetas gráficas *Nvidia*. En la Figura 1 se puede observar un esquema de la estructura utilizada.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 2 se puede observar cómo evoluciona la precisión de la red neuronal para predecir la existencia de fruto en las imágenes. En el eje de abscisas se muestra el número de procesos de entrenamiento que se han realizado, mientras que en el eje de ordenadas se representa la precisión que se obtuvo al ejecutar la predicción con un conjunto de datos de prueba. Se puede ver que al final ronda el 90%, con lo que se puede deducir que, aunque tiene un cierto margen de mejora, se ha conseguido utilizar dicho modelo de manera exitosa para estimar la carga frutal del árbol con dispositivos de bajo coste.

En la figura 3 se puede observar un ejemplo de detección de fruto. Las teselas que se detectan como parte de un fruto se pueden observar como tintadas en rojo.

4. CONCLUSIONES

Existen una gran cantidad distinta de técnicas utilizadas para reconocer objetos de manera automática en una imagen, pero con este trabajo se demuestra que se pueden aplicar técnicas de aprendizaje automático a algunos aspectos de la investigación agronómica.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Investigación e Innovación del Gobierno de España (PCIN-2017-091, WaterWorks2015 ERA-NET) y Manuel Forcen agradece la financiación del contrato predoctoral recibida de la Fundación Séneca (20767/FPI/18).

6. REFERENCIAS

- [1] Kuwata, K., Shibasaki, R. 2015.. 2015 IEEE Geosci. Remote S. 858-861.
- [2] Sharpley, A. N., Smith, S. J., Aruja L.R. 1988. Prediction of Soluble Phosphorus Transport in Agricultural Runoff. *Agr. Water. Manage.* 15: 37-46.
- [3] Zhao, Y., Ma, J., Li, X., Zhang, J., 2018. Saliency Detection and Deep Learning-Based Wildfire Identification in UAV Imagery. *Ah. S. Sens.* 18: 3.
- [4] Sladojevic, S., Arsenovic, M., Anderla, A., Culibrk, D., Stefanovic, D., 2016. Deep Neural Networks Based Recognition of Plant Diseases by Leaf Image Classification. *Comput. Intel. Neurosc.* 2016: ID-3289801.
- [5] Rahnemoonfar, M., Sheppard, C., 2017. Deep Count: Fruit Counting Based on Deep Simulated Learning. *Ah. S. Sens.* 17: 905.
- [6] Kamilaris, A., Prenafeta-Boldú, F. X. 2018. Deep learning in agriculture: A survey, *Comput. Electron. Agric.* 147: 70-90.
- [7] Ezenne, G. I., Jupp, L., Mantel, S. K., Tanner, J. L. 2019. *Agric. Water Manag.* 218: 158-164.
- [8] Abadi, M., 2015. TensorFlow: Large-Scale Machine Learning on Heterogeneous Systems.

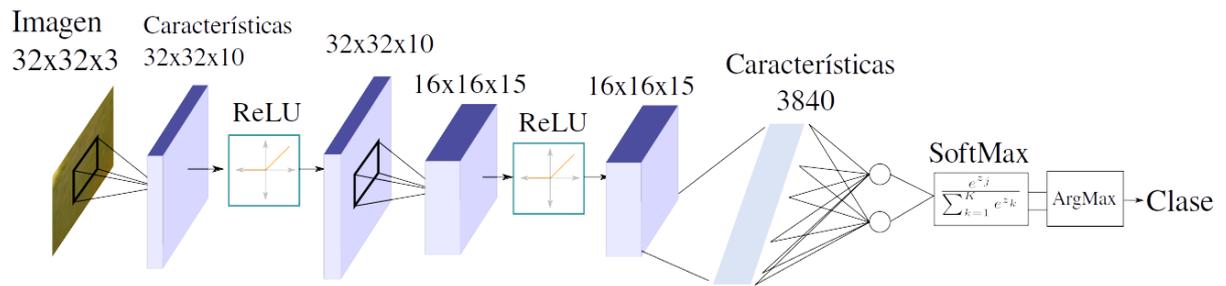


Figura 1. Estructura de la red neuronal convolucional.

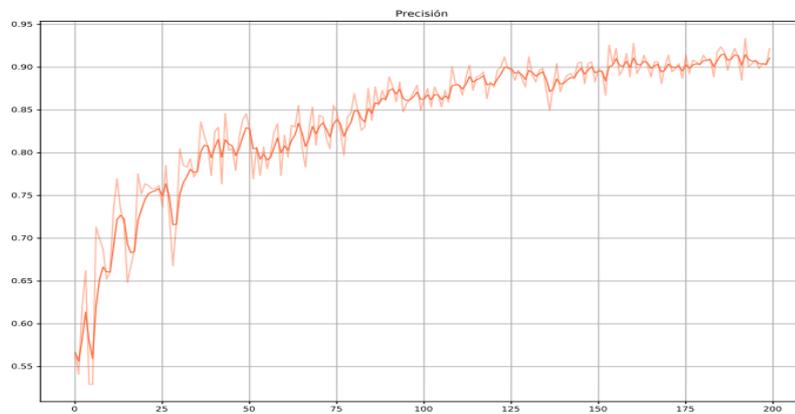


Figura 2. Gráfica de la precisión de la red neuronal durante el proceso de entrenamiento.



Figura 3. Predicción de la presencia de fruto en una fotografía. Lo clasificado como fruto está tintado en rojo

Characterization of the percentage of badly positioned olives in pitting, slicing and stuffing machines of table olives (DRR)

Caracterización del porcentaje de aceitunas mal posicionadas en máquinas deshuesadoras, rodajadoras y relleno de aceitunas de mesa (DRR)

A. Lucas Pascual^{1*}, A. Madueño Luna², M. de Jodar Lázaro¹, J.M. Molina Martínez¹, A. Ruiz Canales³

¹Department of Agronomical Engineering, Universidad Politécnica de Cartagena, 30203 Cartagena. Spain

²Dpto. Ingeniería Aeroespacial y Mecánica de Fluidos. Universidad de Sevilla. Ctra. de Utrera, Km.1, 41013 Sevilla. Spain

³Engineering Department, Universidad Miguel Hernández de Elche, 03312 Orihuela. Spain

*info@albertolucas.es

Abstract

This work provides an analysis of the percentage of poorly positioned olives (boats/beatas) that are generated in DRR machines of olives that incorporate an artificial vision system that evaluates based on the ejection angle selected if the olives are going well or poorly positioned and allows to give practical indications of the optimum angles to the factories to minimize the defects in the punching.

Keywords: pitting machines; table olives; artificial vision; QT Creator; OpenCV.

Resumen

Este trabajo aporta un análisis del porcentaje de aceitunas mal posicionadas (barcos/beatas) que se generan en unas máquinas DRR de aceitunas que incorporan un sistema de visión artificial que evalúa en función del ángulo de expulsión seleccionado si las aceitunas van bien o mal posicionadas y permite dar indicaciones prácticas de los ángulos óptimos a las fábricas para minimizar los defectos en el punzonado.

Palabras clave: máquinas deshuesadoras; aceituna de mesa; visión artificial; Qt Creator; OpenCV.

1. INTRODUCCIÓN

Las máquinas deshuesadoras/rodajadoras de aceituna y de relleno (DRR), son máquinas rotativas empleadas para aceituna de mesa. Estas máquinas por su naturaleza mecánica presentan un porcentaje de error a la hora de posicionar correctamente las aceitunas a ser deshuesadas/rellenadas/rodajadas, como resultado, esas aceitunas no son aptas para consumo y tienen que ser descartadas por varias razones:

- 1.-Se han deshuesado por el eje menor de la aceituna formando lo que se conoce como "barco".
- 2.-Se ha deshuesado en un eje inclinado próximo al eje principal lo que se conocen como "beatas".

En el caso 1, las aceitunas pueden presentar en su interior el hueso entero que no ha podido ser extraído debido a la posición de la aceituna en el momento del deshuesado o de trozos del mismo. El sistema de flotación por densidad (que sigue al proceso de deshuesado), a veces no es capaz de eliminar las aceitunas con esquirlas de hueso con el problema que ello conlleva (salud alimentaria, rotura de punzones y asientos de la máquina DRR).

En el caso 2, las aceitunas se considerarán aptas o no para su consumo en función de los criterios de calidad de la empresa.

Para poder realizar las pruebas se ha desarrollado una interfaz mediante una aplicación QT creator en lenguaje C++ y las librerías de visión artificial OpenCV que permite junto a una cámara industrial y varias modificaciones mecánicas en la máquina DRR, identificar barcos/beatas y con ello determinar su porcentaje. El resultado obtenido con este sistema se ha contrastado con escandallos reales de las aceitunas deshuesadas/rellenadas para cada valor angular seleccionado.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Máquinas DRR

Se han realizado pruebas en ocho máquinas de dos fabricantes preparadas para aceitunas gordales con calibres de 140/150 a 70/80 [1] [2] [3] [4]

- Maq 1, 2, 5 y 6: Sadrym de cola corta modelo 130. Cadena de 3/4".
- Maq 3: Cleser. Modelo 220. Cadena de 1".
- Maq 4, 7 y 8: Sadrym de cola larga modelo 114. Cadena de 3/4".

2.2 Equipo de visión artificial

El equipo de visión artificial empleado consta de una cámara del fabricante Imaging Source modelo DFK 33GV024 y sistema de iluminación Led y un sensor magnético que permite la sincronización con el movimiento de la máquina y con ello el análisis del contenido de cada cangilón de la cadena de alimentación [5]. En la Fig 1 hay un dibujo esquemático.

2.3 Software de visión artificial

Se ha preparado una aplicación en Qt/OpenCV, que permite analizar el contenido presente en cada cangilón de la cadena (cangilón vacío, aceituna bien posicionada, barcos beatas, trozos de aceituna, múltiples aceitunas), generándose un log cada 1000 aceitunas con los valores de cada clase obtenidos. Asimismo, permite seleccionar el ángulo a partir del cual se considera que la aceituna está mal posicionada (barco/beata). En la Fig 2 aparece una captura de pantalla de la aplicación.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha analizado el porcentaje de aceitunas consideradas como mal posicionadas para contrastar con los resultados de catas reales de aceitunas obtenidas a la salida de la máquina DRR.

Se ha realizado para cada máquina en estudio para un mismo calibre de aceituna variando el ángulo desde 10°/170° a 80°/100°. No se estudian los intervalos 0°/180° y 90°/90° ya que respectivamente no consideraría ninguna aceituna como "barco" o las consideraría todas.

En la Fig 3 se muestra a título de ejemplo el porcentaje de barcos sugerido por la aplicación para la máquina 1 con calibre 140/150 con muestreos acumulados de 8 catas cada una de 1000 aceitunas.

El contraste con los escandallos realizados cada 1000 aceitunas muestran experimentalmente que el porcentaje de barcos obtenido es acorde con el intervalo angular $30^\circ/150^\circ$. Por su parte para caracterizar el porcentaje de aceitunas beatas es preferible un intervalo angular más ancho el $40^\circ/140^\circ$.

En la tabla 1 se muestran los resultados de valores medios de barcos para las ocho máquinas analizadas.

4. CONCLUSIONES

Se ha diseñado un equipo basado en visión artificial capaz de caracterizar el contenido de cada cangilón de la cadena de alimentación de una máquina DRR modificada mecánicamente. Para la sincronización con la máquina se usa un sensor magnético que detecta el paso de cada eslabón de la cadena de alimentación y un software basado en Qt/OpenCV que analiza y clasifica cada imagen (vacío, normal barco, beata, doble o trozo).

Los resultados empíricos de los escandallos sugieren que es aconsejable el uso de intervalos de ángulo $30^\circ/150^\circ$ para detectar barcos y de un intervalo más laxo $40^\circ/140^\circ$ para la detección de beatas.

5. REFERENCIAS

- [1] Fernández-Cano, S. 2012. PFC Mejora de las líneas de deshuesado de una envasadora de aceitunas, Escuela técnica superior de ingeniería (ICAI).
- [2] Madueño Luna A., López Lineros M., Madueño Luna, J. M. 2013. Procedimiento basado en un sensor de sincronismo para la detección de fallos de funcionamiento en máquinas deshuesadoras/rodajadoras de aceituna y de relleno, cuantificación y optimización del rendimiento, señalización, monitorización y control remoto. Patente de invención, Propiedad industrial.
- [3] Santos Siles, F.J. 1999 Las nuevas tecnologías aplicadas al sector de la aceituna manzanilla fina. Grasas y Aceites, 50-2, 131-140.
- [4] González, C. 1987. Método para deshuesar y deshuesar-rellenar aceitunas, dispositivo para su puesta en práctica y producto obtenido con el mismo. Número de publicación: ES2000150 A6.
- [5] Da-Wen S., 2008. Computer Vision Technology for Food Quality Evaluation.

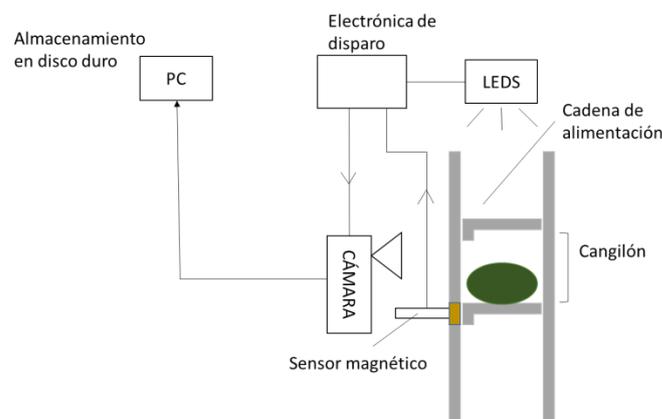


Figura 1. Esquema de los distintos dispositivos usados

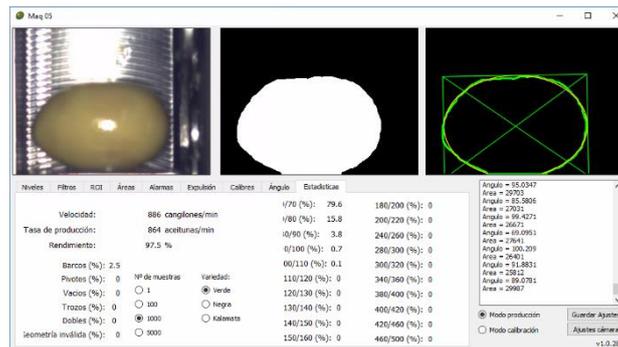


Figura 2. Captura de la aplicación realizada en Qt Creator

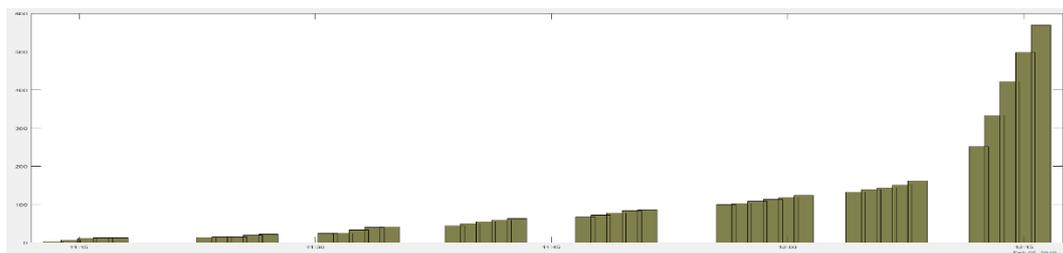


Figura 3. Porcentaje de *barcos* para la máquina 1 con calibre 140/150

Tabla 1. Resultados de valores medios de % *barcos* para las ocho máquinas analizadas.

Ángulo	Maq 1	Maq 2	Maq 3	Maq 4	Maq 5	Maq 6	Maq 7	Maq 8
10/170	2,2	2	6,25	3.75	9	11	8	9,6
20/160	1,6	3,2	10,25	11.75	11,6	14,16	18,2	17,4
30/150	3,6	7	14,25	11.75	12,8	19,16	20,8	25,2
40/140	3,8	8,8	18	11.75	19,5	18,66	25,2	33,4
50/130	3,8	13,8	16,75	15.8	19,75	22,5	17,75	27,6
60/120	4,16	18	25	18	25,8	38	35,2	43,4
70/110	6	60	35,25	76.75	51,5	39,5	86,6	77,4
80/100	63,6	245,4	166,75	322.2	176	143,75	310,4	263,1

Artificial intelligence system for the management of fertigation using weighing lysimetry networks and agronomic sensors

Sistema de inteligencia artificial para la gestión de la fertirrigación mediante redes de lisimetría de pesada y sensores agronómicos

M. Soler*, J.M. Molina

Grupo de I+D+i de Ingeniería Agromótica y del Mar. UPCT. C/Ángel s/n. Ed. ELDI E1.06. 30202 Cartagena. Spain

*manuel.ia@agrosolmen.es

Abstract

It will be developed an efficient and reliable agronomic monitoring tool, to manage irrigation and fertilization in an autonomous and efficient way, considering a prototype of lysimeter established previously by Dr. D. José Miguel Molina Martínez.

Keywords: lysimeter; irrigation; fertilization; efficient; artificial intelligence.

Resumen

Se pretende desarrollar una herramienta de monitorización agronómica, eficaz y fiable a la hora de controlar el riego y la fertilización de forma autónoma y eficiente, a partir de un prototipo de lisímetro de pesada que ha sido previamente establecido por el Dr. D. José Miguel Molina Martínez.

Palabras clave: lisímetro; riego; fertilización; eficiente; inteligencia artificial.

1. INTRODUCCIÓN

Hay multitud de sensores que permiten registrar distintos parámetros agronómicos, como sensores climáticos (ayudan a calcular la dosis de riego en base a ecuaciones experimentales), sensores de planta (se requiere alta cualificación y calibración para su empleo) o sensores de suelo (los más extendidos, que pueden ayudar a mantener un nivel de humedad adecuado, pero ni son precisos, ni dan toda la información posible para una gestión óptima de los cultivos). Todos estos sensores están a nivel comercial, más o menos asequibles, pero fáciles de adquirir. Se tratan en cualquier caso de herramientas que pueden ayudar a los agricultores a satisfacer necesidades puntuales; sin embargo, cuando queremos hacer una integración para solventar de forma global todas ellas, no es fácil encontrar solución. En el mismo sentido, existen multitud de programadores de riego, multitud de equipos de adquisición de datos, multitud de sistemas de comunicación entre equipos, interfaces de comunicación con el usuario, pero la mayor parte de ellos son “cerrados”, de modo que, para realizar una gestión integral de un sistema de riego, un usuario debe tener varias aplicaciones, unas para la monitorización de la humedad, otras para las variables climáticas, otras para el programador de riego, etc.

Se plantea, por tanto, la necesidad de un sistema capaz de interactuar con cualquier dispositivo que requiera el agricultor, para tener una gestión integral de la fertirrigación eficiente, eficaz y simple; y en este sentido el grupo de investigación del Dr. D. José Miguel Molina Martínez lleva años desarrollando un equipo de lisimetría de pesada, capaz de conocer el balance hídrico de los cultivos hortícolas, que presenta un potencial impresionante para poder gestionar no solo el riego, sino también la fertilización, ya que se gestiona de forma eficiente el drenaje que se produce [1,2].

El objetivo que se plantea en el trabajo a realizar es el desarrollo, a partir del lisímetro de pesada establecido por el Dr. D. José Miguel Molina Martínez, un sistema que se puede considerar dotado de INTELIGENCIA ARTIFICIAL, puesto que es ampliamente demostrado que un sistema automático es más eficiente, preciso, productivo, y competitivo técnica y económicamente. Entendemos que esta dotación de inteligencia artificial tiene que operar a tres niveles a la hora de gestionar el riego y la fertilización:

1. Actuación (ejecutar el inicio-parada del riego y la fertilización)
2. Comprobación (visualizar los resultados de la actuación)
3. Toma de decisiones, en base a unos criterios establecidos por el agricultor.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se recabará la información mediante encuestas a agricultores que trabajen con calidad, y mediante revisión bibliográfica, para estandarizar un diseño adaptado al máximo número de cultivos.

Con apoyo multidisciplinar, se realizarán los diseños oportunos hasta llegar a la solución óptima, teniendo en cuenta criterios agronómicos y estructurales, a través de SOLIDWORKS.

La inteligencia artificial se desarrollará a partir de programación de equipos tipo autómatas y/o arduino.

Se fabricarán los prototipos con la coordinación de los distintos oficios que participan.

Se instalarán en puntos de fincas comerciales estratégicamente elegidos para garantizar la mejor representatividad estadística. Se registrarán y analizarán todos los datos para poder establecer relaciones y conclusiones.

Se tratará de desarrollar un sistema de monitorización web multidispositivo, con el apoyo de personal especialista en la materia.

3. RESULTADOS ESPERADOS

Obtención de un equipo de lisimetría de bajo coste, preciso, fiable y práctico que permita al agricultor monitorizar de forma eficiente su cultivo, para proceder a una correcta gestión de la fertirrigación.

Desarrollo de algoritmos de inteligencia artificial que permitan ofrecer recomendaciones válidas al agricultor, o incluso, actuar directamente sobre el sistema de riego, integrando datos ofrecidos por el lisímetro, por sondas de humedad y por estaciones meteorológicas públicas o privadas.

Centralización de forma remota la gestión de la fertirrigación mediante la plataforma web.

4. CONCLUSIONES

Se pretende conseguir que la gestión de riego y la fertirrigación se nutra en tiempo real de las lecturas a través lisímetros de pesada, y un sistema de inteligencia artificial sea capaz de tomar decisiones y actuar sobre los elementos del sistema de riego, siempre con interacción sencilla y eficaz del agricultor.

5. AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto de Investigación y Desarrollo con referencia IDI-20190146 en el que se encuentra incluida mi Tesis Doctoral, titulado “Desarrollo e implantación de un equipo de ferticontrol por lisimetría de pesada para uso en agricultura intensiva”, en colaboración con la empresa AGROSOLMEN, S.L., cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a través del Programa Operativo Plurirregional de España 2014-2020.

6. REFERENCIAS

- [1] Ruiz-Canales A., Nicolás-Cuevas J.A., Fernández-López A., Molina-Martínez J.M. 2018. Lisimetría compacta aplicada al control de los cultivos. Recuperado de <http://www.interempresas.net/Horticola>.
- [2] Ruiz-Peñalver, L., Vera-Repullo, J. A., Jiménez-Buendía, M., Guzmán, I., and Molina-Martínez, J. M. 2015. Development of an innovative low cost weighing lysimeter for potted plants: Application in lysimetric stations. *Agricultural Water Management* 151, 103-113.

Study of soil microbiota through 'omics' techniques and its bioinformatics and biostatistical analysis in samples of horticultural crop diversification

Estudio de la microbiota del suelo mediante técnicas "ómicas" y su análisis bioinformático y bioestadístico en muestras de diversificación de cultivos hortícolas

J. Cuartero^{1*}, M. Ros¹, J.A. Pascual¹, J.M. Vivo²

¹Centro de Edafología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), Campus Universitario de Espinardo, 30100, Murcia, España.

²Departamento de Estadística e Investigación Operativa, Universidad de Murcia, Campus Universitario de Espinardo, 30100, Murcia, España.

*jessica.cuartero@um.es

Abstract

The increasing implementation of intensive agriculture has resulted in soil degradation, which has provoked the diversity reduction and growing economic risks for farmers. As a consequence, we need a more sustainable system that would allow us to keep our current lifestyle without damaging the environment. Crop diversification is an alternative. It is based on growing two or more crops in proximity or using crop rotation technique. Its main benefits are greater diversity and soil stability, greater environmental sustainability and economic benefit. Soil is formed by abiotic and biotic natural elements (which are) closely related, where microorganisms contribute to biochemical cycles, mineralization-stabilization of organic matter, soil structure and growth and development of plants. This thesis proposes a study of soil microorganisms through genomic and metabolomic techniques, which will provide us with a great amount of information on their impact on a complex ecosystem as it is the soil. The application of bioinformatics tools to generate and analyse such huge data will allow us to get outcomes to understand their ecosystem in depth, as well as their relationship with both the abiotic properties and the type of crop, as a way to achieve a more profitable, economic and ecological production.

Keywords: metagenomic; diversity; data.

Resumen

La utilización de la agricultura intensiva ha dado lugar a la degradación del suelo, que ha provocado la reducción de la diversidad y el aumento de riesgos económicos para los granjeros. Por ello, necesitamos un sistema que nos permita mantener nuestro estilo de vida sin dañar el ambiente, como la diversificación de cultivos, basada en el crecimiento de dos o más cultivos en proximidad o la rotación de los cultivos. Su principal beneficio es un aumento de la diversidad y estabilidad del suelo, de la sostenibilidad del ambiente y beneficio económico. El suelo está formado por elementos naturales abióticos y bióticos estrechamente relacionados, donde los microorganismos contribuyen a los ciclos bioquímicos, la mineralización-estabilización de materia orgánica, la estructura del suelo y al crecimiento y desarrollo de las plantas. Esta tesis propone un estudio de los microorganismos del suelo mediante técnicas genómicas y metabolómicas, que nos

aportaran gran cantidad de información en el impacto de su complejo ecosistema, como es el suelo. La aplicación de técnicas bioinformáticas nos permitirá obtener resultados para entender su ecosistema en profundidad, también la relación entre las propiedades abióticas y el tipo de cultivo, con el objetivo de alcanzar una producción más productiva, económica y ecológica.

Palabras clave: metagenómica; diversidad; datos.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la agricultura dio lugar a una transición fundamental en la historia de la humanidad, este cambio hizo que una sociedad nómada de cazadores-recolectores se transformara en una sociedad establecida en un punto concreto de modo que no fuera necesario desplazarse para buscar comida y agua [7] lo que dio lugar a un crecimiento de la población hace unos 12.000 años debido a la permanente posibilidad de alimentos disponibles gracias a los cultivos. Este cambio de la sociedad y su estilo de vida se ha denominado “Revolución neolítica” [9].

Con el tiempo, la realización de prácticas no adecuadas ha provocado que exista un amplio consenso científico en torno a la idea de que nuestro planeta, actualmente, está sufriendo una alteración climática global provocado por el modo de producción y consumo de energía llevado a cabo por los humanos [8] y esto ha provocado un auge en la búsqueda de unas prácticas agrarias sostenibles y ecológicas alternativas al tradicional monocultivo y que permitan alimentar y mantener a la población mundial actual sin repercutir negativamente en las generaciones posteriores. Diverfarming, un proyecto a nivel europeo [10], tiene como objetivo evaluar la diversificación de los cultivos y difundirlo con el objetivo de incrementar la sostenibilidad a largo plazo.

Los objetivos de este trabajo serán realizar un estudio detallado sobre el efecto de la diversidad de los cultivos en las poblaciones microbianas presentes en el suelo, ya que los microorganismos influyen notablemente en prácticamente todas las propiedades del suelo, desde los parámetros fisicoquímicos hasta en los propios cultivos. En un gramo de suelo, existen miles de especies microbianas diferentes [2] lo que da una idea de la importancia que tienen los microorganismos en la formación y calidad del suelo y su importancia para conocerlos y estudiarlos. Actualmente, se estima que un 99% de los microorganismos no son cultivables en el laboratorio [5] por lo que para resolver esta cuestión acudimos a técnicas de secuenciación de genomas (Next Generation Sequencing, NGS), que nos permite estudiar los microorganismos sin necesidad de cultivarlos [3] así como técnicas de metabolómica para estudiar los metabolitos y la funcionalidad de los microorganismos en el suelo.

Para obtener datos ómicos a partir de los resultados experimentales, se emplearán distintas herramientas bioinformáticas, que permitirán depurarlos hasta conseguir la base de datos final. En particular, para obtener conclusiones significativas se aplicarán distintas metodologías estadísticas, tales como el análisis de similitudes (ANOSIM), análisis de la varianza (ANOVA), análisis molecular de la varianza (AMOVA) o el análisis multivariante de la varianza (MANOVA) [6]. Se estudiará además la diversidad (alfa y beta), término introducido por Whittaker en 1960 [1], que ha sido estudiado y valorado por la mayoría de los grupos de investigación dedicados a metagenómica mediante distintos índices de diversidad, como el índice Shannon [4] o chao1 .

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la consecución de los objetivos expuestos anteriormente, se utilizarán dos parcelas experimentales ubicadas en Murcia y con unas dimensiones de aproximadamente 0,2-0,3

hectáreas. En una parcela se utilizará un sistema de cultivo múltiple y de rotaciones, comparando distintos tipos de manejo: convencional, orgánico y biodinámico. En la otra parcela se hará un intercalado de hortalizas con el objetivo de comparar el efecto del monocultivo (hortícolas y leguminosas) frente al intercalado entre cultivos hortícolas y leguminosas con un 30% de disminución en la tasa de fertilización nitrogenada en comparación con el monocultivo.

Se recogerán muestras de suelo en ambas parcelas experimentales, a diferentes tiempos y diferentes lugares. Esta recogida es uno de los puntos clave dentro de este proyecto, ya que hay muchos factores que pueden afectar a la diversidad microbiana. A partir de la muestra, se utilizarán técnicas de biología molecular para identificar los microorganismos y se realizará un análisis bioinformático y bioestadístico exhaustivo para conocer a fondo la diversidad presente en los distintos tratamientos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se espera obtener como resultados la comparación bioinformática entre las distintas herramientas disponibles (como los programas en QIIME), con el objetivo de ser capaz de mejorar y estandarizar el preprocesamiento bioinformático de los resultados obtenidos por el secuenciador Ion Torrent en muestras de suelo. Además, se realizarán modificaciones de los argumentos usualmente aceptados en las herramientas de clasificación no supervisada (por ejemplo, en las distancias o en las matrices del cluster) con el fin de mejorar la precisión en la clasificación taxonómica.

Se obtendrá un análisis estadístico exhaustivo de cada uno de los casos de estudio, principalmente a través del entorno de R, pero también se realizará en algunos casos mediante otro tipo de programas, como por ejemplo un análisis de componentes principales utilizando R o QIIME, con el objeto de encontrar también las mejores herramientas bioestadísticas que, aplicadas en muestras de suelo, nos permitan extraer la máxima información posible y relacionar diversidad con: parámetros fisicoquímicos, condiciones de recogida de muestra, características del terreno, etc.

Por otro lado, se espera obtener una base de datos que contenga los distintos metabolitos presentes en las muestras de suelo, los cuales habrán sido determinados experimentalmente a través de diferentes técnicas metabolómicas “non-target”, con el objetivo de realizar un análisis bioinformático y bioestadístico comparativo entre los resultados obtenidos, tanto a nivel genético como a nivel metabolómico. Para ello se combinarán diferentes técnicas, comenzando por estadística básica y finalizando con la utilización de técnicas de aprendizaje tales como redes neuronales (machine learning) ampliamente utilizadas en datos derivados tanto de sistemas biológicos como ambientales, que proporcionarán sistemas de clasificación.

Finalmente, se realizará una agrupación y comparación de los datos y los distintos análisis realizados previamente con el fin de clasificar tanto: a nivel de diversidad, parámetros fisicoquímicos y metabolitos cada uno de los tratamientos empleados, logrando así diferenciar de manera clara y precisa los distintos tratamientos utilizados y poder compararlos de un modo preciso entre ellos.

4. CONCLUSIONES

El desarrollo de esta Tesis Doctoral permitirá seleccionar de un modo eficaz el tipo de cultivo, más sostenible y económico, para ponerlo en práctica a nivel industrial en la Región de Murcia y además permitirá clasificar y conocer detalladamente el ecosistema creado entre un cultivo y los microorganismos presentes en el suelo permitiendo al agricultor potenciar de

manera natural y sostenible dicho ecosistema y que le permita obtener mejores cosechas y mayor producción.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradecer al proyecto Diverfarming del programa H2020 perteneciente a la unión europea (Grant Agreement (728003)) la financiación necesaria para poder realizar esta tesis. También quiero agradecerle al grupo de investigación E079-06 “Estadística: Modelos, Métodos y Aplicaciones” de la Universidad de Murcia el asesoramiento estadístico de todo el proyecto.

6. REFERENCIAS

- [1] Calderón-Patrón J.M., Moreno C.E., Zuria I. 2012. La diversidad beta: medio siglo de avances. *Rev. Mex. Biodivers.* 83: 879-891.
- [2] Delmont T. O., Prestat E., Keegan K.P., Faubladier M., Robe P., Clark, I.M., Le Paslier D. 2012. Structure, fluctuation and magnitude of a natural grassland soil metagenome. *ISME journal.* 6: 1677.
- [3] Handelsman J., Rondon M.R., Brady S.F., Clardy J., Goodman R.M. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* 5: R245-R249.
- [4] McPherson M.R., Wang P., Marsh E.L., Mitchell R.B., Schachtman D.P. 2018. Isolation and Analysis of Microbial Communities in Soil, Rhizosphere, and Roots in Perennial Grass Experiments. *JoVE Journal.* 1:137.
- [5] Schloss P.D., Handelsman J. 2005. Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot. *Genome Biol.* 6: 229.
- [6] Schloss P.D., Handelsman J. 2008. A statistical toolbox for metagenomics: assessing functional diversity in microbial communities. *BMC Bioinformatics* 9: 34.
- [7] Thrall P.H., Bever J.D., Burdon J.J. 2010. Evolutionary change in agriculture: the past, present and future. *Evol. Appl.* 3:405.
- [8] Veroz O., Carbonell R. 2011. La agricultura y el cambio climático. 1st ed, E.J. González, J.A. Gil, R. Ordóñez, eds. (Asociación Española Agricultura de Conservación. Suelos Vivos). Pp 19.
- [9] Weisdorf J.L. 2005. From foraging to farming: explaining the Neolithic Revolution. *J. Econ. Surv.* 19: 561-586.
- [10] Zornoza R. 2017. Diverfarming. Recuperado de: <http://www.diverfarming.eu/index.php/es/>

Improvement of the competitiveness on the sea bass (*Argyrosomus regius*) sector through genetic selection

Mejora de la competitividad del sector de la corvina (*Argyrosomus regius*) a través de la selección genética

A. Vallecillos^{1*}, E. María Dolores¹, J. Villa², E. Armero¹

¹Área de producción animal. Departamento de Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena. Spain

²Colaborador de la empresa Alevines del Sureste S.L., calle Cabo Cope s/n, 30880 Águilas, Murcia. Spain

*vallecillosquijada@gmail.com

Abstract

The sea bass (*Argyrosomus regius*) is a species with a wide geographic range of distribution in the nature of the Mediterranean Sea, and whose production is increasing. In order to know the main productive factor, it is interesting to know the genetic variation of the species, increasing our level of knowledge that is associated with the raising of sea bass in industrial conditions, from the technological and genetic point of view. The phases involved in the application of a breeding program, as the population variation, the determination of the numerator relationship matrix (NRC) and the definition of the characteristics and objectives of the selection. The characteristics that will be valued are, growth rate, and the overall quality of the fish and its flesh. Nowadays there is not any sea bass breeding program, which allows us to have a better phenotypic and genetic characterization, and an industrial benefit in terms of genetic transfer among the sector companies.

Keywords: growth; quality; heritability; microsatellite; multiplex.

Resumen.

La corvina (*Argyrosomus regius*) es una especie con un amplio abanico geográfico de distribución que abarca todo el Mar Mediterráneo, y cuya producción se encuentra en aumento. Para poder conocer los principales factores productivos es interesante conocerla variación genética de la especie, aumentando nuestro nivel de conocimiento que va asociado a la crianza de la corvina en condiciones industriales, desde el punto de vista tecnológico, y genético. Las fases que conlleva la aplicación de un programa de mejora genética son el estudio de la variación de la población base, la determinación de la matriz de parentesco y la definición de los caracteres y objetivos de selección. Los caracteres a valorar serán, de crecimiento, y de la calidad integra del pez y de la carne. Actualmente no hay ningún programa de mejora genética en corvina, que nos permita tener una mejor caracterización fenotípica y genética, y un beneficio industrial en cuanto a una transferencia genética entre las empresas del sector.

Palabras clave: crecimiento; calidad; parámetros genéticos; microsatélite; parentesco.

1. INTRODUCCIÓN

La corvina (*Argyrosomus regius*) es una especie con un amplio abanico geográfico de distribución en la naturaleza que abarca todo el Mar Mediterráneo. En España se empieza a trabajar con esta especie gracias al protocolo de crianza de Cárdenas [1]. La producción de corvina mediante acuicultura en España en 2016 ha sido de 1.798 toneladas, un 9,5 % más que en 2015. Para 2017 se estimó un crecimiento del 8 % hasta alcanzar las 1.950 toneladas. Dentro del territorio español (APROMAR 2014) la Comunidad Valenciana y Murcia son las de mayor producción.

La corvina es un pescado muy apreciado en aquellas regiones en las que se ha consumido tradicionalmente, sin embargo, dada su escasa pesca y el reciente inicio de su producción mediante acuicultura, es poco conocido en la mayor parte de los mercados.

Las empresas españolas ya llevan a cabo distintas actuaciones en el ámbito de la alimentación, del manejo de los lotes, de la prevención de enfermedades e incluso de la ubicación de sus instalaciones. Sin embargo, han sido muy escasas las estrategias dirigidas a la intervención genética de base zootécnica sobre los núcleos de reproductores y sus descendientes.

La aplicación de un programa de mejora genética implica el estudio de la variación genética de la población base, la determinación de la matriz parentesco y la definición de los caracteres objeto de la selección.

La variación genética de la población de partida es de gran importancia para el desarrollo de un programa de mejora genética. En corvina el único estudio que existe sobre caracterización genética de las poblaciones ha sido llevado a cabo sobre microsatélites, indicando que la variación genética de las poblaciones que poseen actualmente las empresas y los centros de investigación de corvina es muy alta [2].

El uso simultáneo de sistemas de marcaje físico y marcadores genéticos microsatélites, permite inferir y trazar la matriz de parentesco de los peces. En relación con los sistemas de marcaje físico, Astorga [3] pusieron a punto el sistema VIE para alevines de dorada. También en Dorada (*Sparus aurata*), Navarro [4] establecieron la metodología para marcar individualmente los peces con el sistema de marcaje PIT, a partir de 3 gramos de peso.

Los caracteres a valorar serán caracteres de crecimiento (peso y talla), y de la calidad íntegra del pez y de la carne (valoración morfológica del pez, rendimiento canal y de filete, color de la piel, contenido en humedad, grasa, proteína, colágeno, perfil de ácidos grasos) [1,5,6]. Dentro de las principales características de la corvina destaca una tasa de crecimiento muy alta, pudiendo alcanzar los dos kilos en dos años. Además, tiene un alto porcentaje de rendimiento de la carne, bajo niveles de grasa muscular y un saludable contenido lipídico.

El objetivo del presente proyecto es establecer un programa de mejora genética en corvina, con la colaboración de la empresa Alevines del Sureste S.L. del Grupo Andromeda, quien en la actualidad lidera el mercado en cuanto a producción y comercialización de la corvina. Para ello se va a llevar a cabo un análisis de genealogías mediante una multiplex de marcadores microsatélites, y el control de producciones de los caracteres de interés industrial (crecimiento, calidad íntegra del pez y calidad de carne).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Puestas masales

Se establecerán puestas masales, a partir de un núcleo de reproductores. Se tomarán puestas centrales de dos días consecutivos para asegurar el mayor número de familias posibles en el desarrollo de los objetivos marcados. Las puestas se recogerán en el periodo intermedio de

la misma para maximizar la contribución familiar en cualquiera de los diseños de lotes. Si la puesta es viable en cantidad suficiente, se utilizará para su alevinaje y engorde. El cultivo larvario de las puestas seleccionadas se realizará con la metodología estándar [7,8]

2.2 Marcaje, alevinaje y engorde

Cuando se reciban los alevines, se aclimatarán, y se llevarán a un peso medio de 3 g momento en el cual se marcarán individualmente en cavidad abdominal mediante el sistema Passive Integrated Transponder (PIT), hasta 1200 alevines. A la vez se obtendrá un trozo de la aleta caudal de cada pez marcado el cual será conservado en alcohol para la caracterización genética mediante marcadores microsatélite. En este momento se valorarán los parámetros de interés (peso, longitud y anomalías morfológicas). Los peces marcados serán cuidados minuciosamente durante al menos 20 días con el fin de asegurar una cicatrización perfecta y minimizar la tasa de pérdidas del PIT. En ese momento, los peces serán transferidos a la jaula, donde se criarán hasta la talla de comercialización.

2.3 Calidad del pez y de la carne

La calidad de pez y de carne se medirá del siguiente modo:

Textura: se utilizará un texturómetro con un test de análisis de perfil.

Color de la piel: se medirá en el tercio anterior por encima de la línea lateral, mediante un colorímetro Minolta.

Colágeno total en músculo: mediante análisis NIR.

Composición química del músculo: determinación de los porcentajes de humedad, proteína, grasa y cenizas mediante análisis NIR.

Grasa visceral: mediante la separación de toda la grasa que se encuentre en cavidad peritoneal alrededor del digestivo.

Valoración morfológica: para ello se hará fotografías laterales u dorsales a cada pez sobre fondo rojo y con una regla blanca.

Rendimiento canal: se obtendrá mediante el pesado del pez entero una vez eviscerado y secado con una balanza de precisión

Rendimiento filete: Se obtendrán los filetes que se pesarán los filetes de ambos lados con una balanza de precisión

Calidad comercial del pez: medida mediante la valoración visual de los peces de cualquier deformidad esquelética que presenten, especialmente opérculo, lordosis, fusiones y cabeza.

2.4 Determinación de relaciones de parentesco mediante PCR multiplex

A partir de aleta caudal se procederá a la extracción del ADN mediante el kit DNAeasy (QIAGEN®). Una vez obtenido el ADN se realizarán PCR, inicialmente individuales, para cada uno de los marcadores microsatélites propuestos por Soula M. [2]. Y otros marcadores propuestos por diversos autores[5,9,10,11]. Los electroforegramas y genotipos serán analizados con GeneMapper software v.3.7 (Life Technologies®). También serán caracterizados los reproductores. La asignación de parentesco entre los reproductores y sus descendientes será realizada mediante Vitassing software v.8.2.1 [12]

3.5 Estimaciones de parámetros genéticos

Las estimaciones de parámetros genéticos serán realizadas mediante métodos de máxima verosimilitud, utilizando los programas desarrollados por MISZTAL[13].

3. RESULTADOS ESPERADOS

Durante el periodo desarrollado del proyecto, se ha comenzado con el control de las puestas por parte de los reproductores, actualmente se encuentran en la fase de alevinaje hasta su traslado a las jaulas en el mediterráneo para su engorde. Paralelamente se ha realizado una búsqueda bibliográfica para la puesta a punto del test de parentesco mediante marcadores microsatélites.

4. AGRADECIMIENTOS

A la fundación Seneca por su apoyo económico tanto con la beca de doctorado como por el proyecto (Mejora de la competitividad del sector de la corvina a través de la selección genética (GENECOR)) y a la empresa Alevines del Sureste s.l. del Grupo Andromeda.

5. REFERENCIAS

- [1] Cárdenas S. 2011. Cultivo de corvina ('*Argyrosomus regius*'). Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Fundación Observatorio Español de Acuicultura.
- [2] Soula M., Zamorano M. J., Navarro A., Sánchez J.J., Neil D., Alejandro G., Afonso J. M. 2011 Congreso nacional de acuicultura. Barcelona.
- [3] Astorga N, Afonso JM, Zamorano MJ, Montero D, Oliva V, Fernández H, and Izquierdo MS. 2005. Evaluation of visible implant elastomer tags for tagging juvenile gilthead seabream (*Sparus auratus* L.); effects on growth, mortality, handling time and tag loss. *Aquaculture Research* **36**:733–738.
- [4] Navarro A, Oliva V, Zamorano MJ, Ginés R, Izquierdo MS, Astorga N, and Afonso JM. 2006. Evaluation of PIT system as a method to tag fingerlings of gilthead seabream (*Sparus auratus* L.): effects on growth, mortality and tag loss. *Aquaculture* **257**:309–315.
- [5] García-Pacheco MM and Bruzón MA. 2009. Gametogenic cycle and first sexual maturity size of meagre, *Argyrosomus regius*. *4th Workshop on Gonadal Histology of Fishes. Centro IFAPA El Toruño, El Puerto de Santa María, Cádiz* p. 16–19.
- [6] Quero J-C and Vayne J-J. 1985. Le maigre, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) (Pisces, Perciformes, Sciaenidae) du Golfe de Gascogne et des eaux plus septentrionales. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches maritimes* **49**:35–66.
- [7] Duncan NJ, Mylonas CC, Sullon EM, Karamanlidis D, Nogueira MCF, Ibarra-Zatarain Z, Chiumento M, and Carrillo OA. 2018. Paired spawning with male rotation of meagre *Argyrosomus regius* using GnRH α injections, as a method for producing multiple families for breeding selection programs. *Aquaculture*.
- [8] Duncan N, Estévez A, Porta J, Carazo I, Norambuena F, Aguilera C, Gairin I, Bucci F, Valles R, and Mylonas CC. 2012. Reproductive development, GnRH α -induced spawning and egg quality of wild meagre (*Argyrosomus regius*) acclimatised to captivity. *Fish physiology and biochemistry* **38**:1273–1286.
- [9] Turner TF, Richardson LR, and Gold JR. 1998. Polymorphic microsatellite DNA markers in red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Molecular Ecology* **7**:1771–1773.
- [10] Archangi B, Chand V, and Mather PB. 2009. Isolation and characterization of 15 polymorphic microsatellite DNA loci from *Argyrosomus japonicus* (mulloway), a new aquaculture species in Australia. *Molecular Ecology Resources* **9**:412–414.
- [11] Farias IP, Muniz LB, ASTOLFI-FILHO S, and Sampaio I. 2006. Isolation and characterization of DNA microsatellite primers for *Cynoscion acoupa*, the most exploited sciaenid fish along the coast of Brazil. *Molecular Ecology Notes* **6**:660–663.
- [12] Vandeputte M, Mauger S, and Dupont-Nivet M. 2006. An evaluation of allowing for mismatches as a way to manage genotyping errors in parentage assignment by exclusion. *Molecular Ecology Notes* **6**:265–267.
- [13] MISZTAL R, Tsuruta S, Lourenco D, Aguilar I, Legarra A, Vitezica Z, and ENSAT F. Manual. 1993.

Analysis of gene function by CRISPR/Cas9 deletions and transcriptomics

Análisis de la función génica mediante deleciones por CRISPR / Cas9 y transcriptómicas

N. Nmichi^{1,2*}, B. Badaoui¹, J. Weiss², M. Egea Cortines²

¹Faculté des Sciences, Université Mohammed V de Rabat. Morocco

²Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena. Spain

*nada.nmichi@gmail.com

Abstract

CRISPR-Cas9, a revolutionary technique currently used to modify the genome in a precise way, is based on DNA repair mechanisms activated locally by DNA breakage. CRISPR is associated with an endonuclease called Cas9. This complex is directed by a gRNA (guide) conferring specificity of action to a given DNA sequence. The aim of the present work is to use the CRISPR / Cas9 technique to develop a series of mutagenetic plants using *in vitro* transformation.

Keywords: CRISPR/Cas9; genetic engineering; developmental genetics.

Resumen

CRISPR-Cas9, una técnica revolucionaria actualmente utilizada para modificar el genoma de una manera precisa, se basa en los mecanismos de reparación del ADN activados localmente por la rotura del ADN. CRISPR se asocia con una endonucleasa llamado Cas9. Este complejo está dirigido por un gRNA (guía) que confiere especificidad de acción para una secuencia de ADN dada. El objetivo del presente trabajo es utilizar la técnica CRISPR / Cas9 para desarrollar una serie de plantas mutagénicos utilizando la transformación *in vitro*.

Palabras clave: CRISPR/Cas9; ingeniería genética; genética del desarrollo.

1. INTRODUCTION

Genome editing is a technique that allows controlled modification of genetic information, using homologous recombination. Adding and modifying bases in DNA sequences has become progressively easier. The genome revolution is in progress after the discovery of CRISPER technique. The CRISPR / Cas9 system includes the non-specific endonuclease (Cas9) and gRNA that is responsible for transporting Cas9 to the targeted DNA site (figure 1).

The Cas9 enzyme generates cleavages in the double-stranded DNA using its two catalytic centers to cleave the target DNA next to the PAM sequence which corresponds to a 20 nucleotide sequence of the guide RNA (sgRNA) [1].

The use of the CRISPR / Cas 9 system for eukaryotic genomes allows a modification of several traits simultaneously and precisely. Moreover, this technique does not require any protein engineering process [2].

Several research studies have shown that the CRISPR / Cas9 technology has been successfully used in *Petunia*. The objective of the thesis proposal is to use the CRISPR / Cas9 technique to develop a series of mutagenetic plants using *in vitro* transformation [3].

The aim of the present PhD proposal is to use the CRISPR / Cas9 technique to develop a series of mutagenetic plants using *in vitro* transformation

2. MATERIALS & METHODS

2.1. Plant material

The plants chosen for this investigation, *Petunia hybrida* and *Antirrhinum majus*, will be grown in a growth chamber under controlled conditions. For transformation of the CRISPR / Cas9 constructs, seeds of the *Antirrhinum majus* line 165E and of *Petunia hybrida* variety Mitchell will be sterilized on the surface, and grown on Murashige and Skoog medium in a growth chamber under a photoperiod of 12/12 h light / dark and a temperature of 25°C / 18°C. Transformation will be performed on hypocotyls (*A.m.*) or leaves (*P.h.*).

2.2. Vector construction

The constructions were made following conventional construction cloning procedures. Primers of gRNA for PCR will be designed in order to confirm certain genes within the construct (Figure 2).

2.3. Transformation by *Agrobacterium*

The plant transformation chosen in this study will be carried out using *Agrobacterium tumefaciens* via a vector appropriate to the specific context.

3. RESULTS AND PROSPECT

To develop a series of CRISPR/Cas9 alleles in several plants in order to obtain loss of function alleles in several genes.

To develop transgenic plants via *in vitro* transformation, help to genotype the outcoming T0, and obtain T1 segregating plants for further phenotypic analysis.

To establish homozygous lines for transcriptomic and bioinformatic analysis in order to identify target genes that can be modified by the loss of function alleles in the target tissues.

4. CONCLUSIONS

New genomic editing techniques have become easier and faster. The CRISPR/Cas9 system is a valuable tool for genome editing. The system has allowed researchers to perform accurate genetic modifications, easier to use and cheaper compared the previous gene editing techniques such as Transcription activators-like effective nucleases (TALENs).

An additional advantageous lies in the fact that this technology has the ability to modify several genes simultaneously.

5. ACKNOWLEDGMENTS

The experiments will be conducted at the Institute of Plant Biotechnology (IBV), Cartagena, Polytechnical University of Cartagena (UPCT)

6. REFERENCES

- [1] Doudna E.J.A., Charpentier E. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 Science. 346(6123): 1258096.
- [2] Ran F. A., Hsu P. D., Wright J., Agarwala V., Scott D. A., Zhang F. 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nature Protocols. 8(11):2281–2308. doi:10.1038/nprot.2013.143
- [3] Zhang B., Yang X., Yang C., Li M., Guo Y. 2016. Exploiting the CRISPR/Cas9 System for Targeted Genome Mutagenesis in Petunia. Scientific Reports, 6(1). doi:10.1038/srep20315

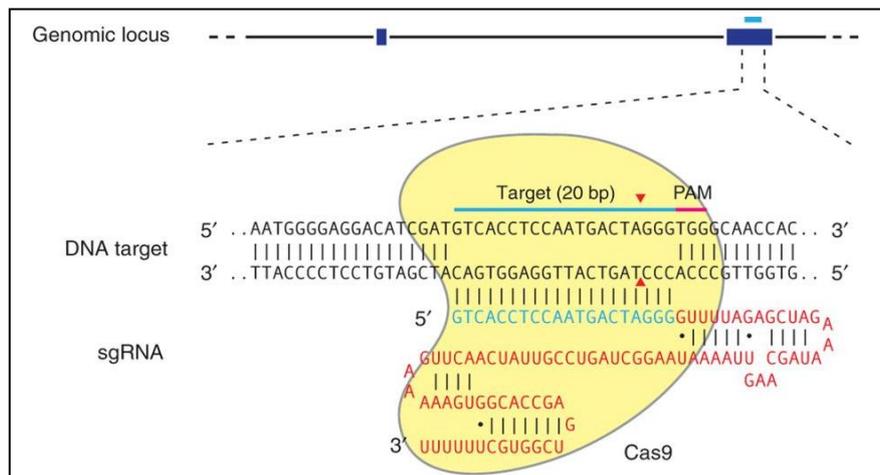


Figure 1. Schematic of the RNA-guided Cas9 nuclease [1].

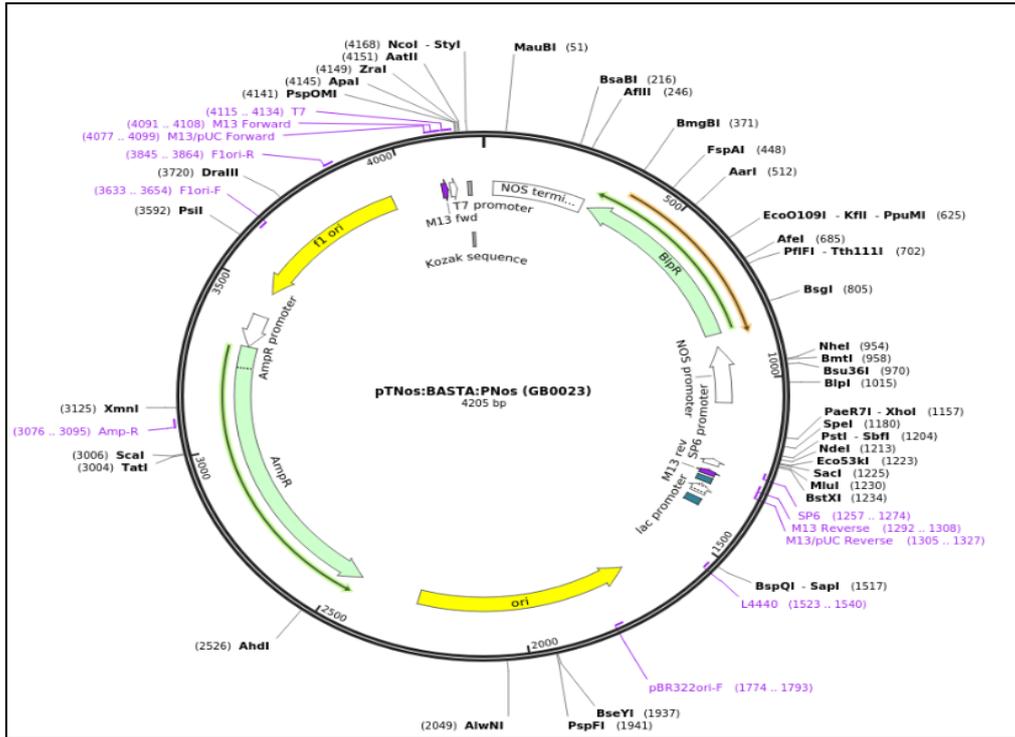


Figure 2. pTNos:BASTA:PNos Vector system will be used in this experimental setup.

Agroindustrial composts aimed at improving the quality of horticultural crops and inducing resistance to phytopathogens. Study of the biological mechanisms involved

Composts agroindustriales dirigidos a la mejora de la calidad de cultivos hortícolas e inducción de resistencia a fitopatógenos. Estudio de los mecanismos biológicos implicados

A. Hernández*, M. Ros, J.A. Pascual

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

*aliciahernandezlara@gmail.com

Abstract

In this Doctoral Thesis will be demonstrated the benefits of the use of agroindustrial compost as biofertilizer and inducer of healthy properties in the cultivation of lettuce and spinach baby-leaf to be used as minimally processed food in fresh (MPF); they will be also studied as biopesticide against different plant pathogens within a sustainable intensive agriculture. Some organic materials will be used as "BASE" of composting to which they will be implemented by other organic residues or by-products to obtain compost and its extract; thus on the one hand, it will have biofertilizing and inducing properties of healthy properties and, on the other hand, suppressive activity against important plant pathogens affecting lettuce (*Pythium irregulare*) and spinach (*Peronospora farinosa*). For this study, bioassays will be assayed in controlled conditions, in which a battery of "omics" techniques will be applied in order to determine the cause-effect relationship existing in the composts that determine an improvement in the growth and disease control.

Keywords: soil; suppressiveness; healthy products; spinach; lettuce; compost.

Resumen

En esta Tesis Doctoral se demostrará los beneficios que tiene el uso de compost agroindustriales diseñados para tener propiedades biofertilizantes e inductor de propiedades saludables en cultivos hortícolas como la lechuga y espinaca baby-leaf mínimamente procesados en fresco (MPF), así como biopesticida frente a diferentes fitopatógenos de dichos cultivos dentro de una agricultura sostenible. Se emplearán diversos residuos orgánicos que tras un proceso de compostaje dirigido, darán lugar a compost que podrán tener efectos beneficiosos en el crecimiento de las plantas, tales como biofertilizante, así como control de enfermedades de planta tales como *Pythium irregulare* en lechuga o *Peronospora farinosa* en espinaca. Para este estudio, se emplearán bioensayos en condiciones controladas, en los que se aplicaran diferentes técnicas moleculares y "ómicas" con el objeto de poder determinar la relación causa-efecto

existente en los composts que determinan una mejora en el crecimiento y control de enfermedades.

Palabras clave: suelo; supresividad; compuestos saludables; espinaca; lechuga.

1. INTRODUCCIÓN

La producción de compost conlleva innumerables beneficios convirtiendo “residuos o subproductos” en un “recurso” que puede ser aprovechado tanto en la mejora de la calidad del suelo como en la producción de los cultivos vegetales [1,2]. Algunos composts poseen valores añadidos como es el carácter supresivo que presentan frente a diferentes patógenos [3] y/o un efecto biofertilizante y bioestimulante capaz de promover no sólo el crecimiento vegetal, sino potenciar el aumento de componentes biológicamente activos en vegetales/frutas que aporten beneficio para la salud o efectos fisiológicos deseables [4]. Estas propiedades de valor añadido (biofertilizante, bioestimulante y biopesticida) pueden ser incorporadas a los compost mediante el empleo de componentes concretos incorporados durante el proceso [5].

Los vegetales mínimamente procesados en fresco (MPF) son una serie de alimentos que han tenido un rápido desarrollo en pocos años. Se trata de productos acondicionados para su consumo directo, que se conservan refrigerados y envasados en atmósferas modificadas. Se busca que sus propiedades nutritivas y organolépticas tengan pocos cambios respecto al vegetal original. La utilización de compost o extractos de compost en la producción de este tipo de hortalizas de hoja puede favorecer no solo la producción del cultivo sino la calidad del mismo.

La producción de plantas se puede ver afectada por enfermedades que afectan al crecimiento y la calidad del cultivo. La incidencia por ejemplo de *Pythium irregulare*-lechuga o *Peronospora farinosa* en espinaca provoca daños irreparables en las plantas.

Para el control de estas enfermedades se utilizan principalmente fungicidas. Debido a la restricción en el uso de estos, su producción en España se está dificultando comparada con otros países, siendo necesario el apostar por alternativas que sustituyan o reduzcan el uso de estos fungicidas mediante el uso de compost/ extractos supresivos como enmienda orgánica de suelo o sustratos de cultivo, unido a unos manejos agrarios sostenibles

El estudio en profundidad de los mecanismos de supresión de los composts, nos puede y debe ayudar a realizar un manejo más sostenible de los mismos, ya que la mayoría de las veces son varios mecanismos los responsables de la supresión de los composts/extractos/suelos. a) competición por carbón y nutrientes; b) producción de antibióticos y compuestos fitotóxicos; c) hiperparasitismo o eliminación de patógenos mediante liberación de enzimas líticas; d) mejora de estado nutricional de la planta y nutrientes; d) inducción de resistencia en la planta. Se ha demostrado que las plantas pueden ser sometidas a una activación más eficiente de su capacidad defensiva (priming), el cual puede ser inducido por estímulos de patógenos, de microbios beneficiosos, e incluso de compuestos naturales o sintéticos, que podrían estar incluidos en los composts. Para el estudio de los mecanismos que inducen este tipo de beneficio en la planta existe la necesidad de profundizar en el conocimiento, aprovechándonos de la información que arrojan las técnicas ómicas (metagenómica, metatranscriptómica, metabolómica); siendo de especial relevancia su estudio a nivel de rizosfera, raíz y parte aérea [6].

El objetivo general de la Tesis Doctoral es obtener compost con capacidad biocontrol y bioestimulante en cultivos hortícolas y estudiar en profundidad los mecanismos de supresión, mediante aproximación de técnicas moleculares y ómicas, las cuales nos permitirán discernir la relación causa-efecto existente en los composts que determinan una mejora en el crecimiento y control de enfermedades permitiendo un manejo agrícola más sostenible.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la consecución de los objetivos se realizará un proceso de compostaje dirigido a partir de diferentes materiales de partida que previamente han mostrado determinado interés; de modo tal que se obtendrá composts/extractos bioestimulantes, biofertilizantes y supresivo frente a patógenos de suelo como por ej. *Pythium irregulare-lechuga* o *Peronospora farinosa-espinaca*.

Una vez obtenidos diferentes combinaciones de composts, se realizará ensayos de bioestimulación y supresividad, seleccionando aquellos que muestren una mejor capacidad. A partir de estos bioensayos, se procederá a profundizar en el conocimiento de las causas y/o mecanismos responsables de estos efectos mediante diferentes técnicas de análisis de expresión de genes relacionados con la inducción de resistencia sistémica y adquirida, medidas de actividades enzimáticas y “ómicas” como la metagenómica, transcriptómica y metabolómica”.

3. RESULTADOS ESPERADOS

Se prevé obtener compost y extractos de composts supresivos frente a patógenos como *P. irregulare/lechuga* o *P. farinosa/ espinaca*, y conocer en profundidad que mecanismo/s tienen mayor peso dentro de los procesos de supresión y quien o quienes son los responsables o porque de la mejora de las cualidades saludables de las plantas para enmarcarlo dentro de un uso sostenible en la agricultura. Para ello se emplearán técnicas de última generación denominadas ómicas, que permitirá realizar análisis de trazabilidad de los potenciales mecanismos desde el compost hasta la parte aérea de la planta.

Se realizarán bioensayos donde se utilizarán los composts o sus extractos como sustrato de cultivo a los que a una parte se le habrá infectado con los fitopatógenos y la otra parte se quedará como control. Durante la germinación y crecimiento de lechuga y espinaca, se tomarán muestras destructivas de rizosfera, parte aérea y raíz, las cuales serán analizadas mediante las diferentes técnicas ómicas. De esta manera se podrá disponer de información necesaria para poder discernir los atributos presentes en los composts que son capaces de inducir efectos beneficiosos y biopesticida en los cultivos.

Mediante la metagenómica se esperará encontrar diferencias estructurales en la microbiota. Determinaremos que composts son capaces de inducir resistencia a diferentes enfermedades según la microbiota que encontremos. Y, por último, las técnicas metabolómicas a emplear nos deben de corroborar los resultados anteriores, encontrando metabolitos relacionados con los efectos que veamos con el resto de técnicas en estudio.

Este tipo de técnicas generará una elevada cantidad de información, la cual deberá ser tratada con técnicas de tratamientos de datos “big data” que implicará el empleo de técnicas bioinformáticas y estadísticas de última generación, las cuales nos permitirá correlacionar toda la información recogida con los efectos sobre la respuesta de la planta, en cuanto a crecimiento, capacidad de adaptarse a condiciones de presión de patógeno, estado nutricional, etc.

4. CONCLUSIONES

Tras el estudio realizado en este trabajo, se podrá obtener un protocolo de desarrollo de compost supresivo y/o bioestimulante para su uso como sustrato de cultivo en plantas hortícolas como la lechuga o la espinaca que mejore su capacidad bioestimulante y muestre un efecto biocontrol frente a los patógenos de planta. Y para ello, se habrá tenido que profundizar en el conocimiento de los mecanismos responsables de la supresión y del efecto bioestimulante en la planta para realizar un uso adecuado mejorando con ello el medioambiente dentro del marco de una agricultura sostenible.

5. AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio de Economía, Industria y Competitividad por la financiación recibida para llevar a cabo el proyecto AGL 2017-84085-C3-1-R

6. REFERENCIAS

- [1] Ros M., Pascual J.A., García C., Hernández M.T., Insam H. 2006. Hydrolase activities, microbial biomass and bacterial community in a soil after long-term amendment with different compost, *Soil Biol Biochem.* 38 (12): 3443-3452.
- [2] Ros M., García C., Hernández M.T. 2007. Evaluation of different pig slurry compost as fertilizer of horticultural crops: effects on selected chemical and microbial properties. *Renew Agr Food Syst.* 22 (4): 307-315.
- [3] Hadar Y., Papadopoulou K. 2012. Suppressive Composts: Microbial Ecology Links Between Abiotic Environments and Healthy Plants. *Annu Rev Phytopathol.* 50: 133-153.
- [4] Serafini M., Bugianesi R., Salucci M., Azzini E., Raguzzini A., Maiani G. 2002. Effect of acute ingestion of fresh and stores lettuce (*Lactuca sativa*) on plasma total antioxidant capacity and antioxidant levels in human subjects. *Brit. J. Nutr.* 88 (6): 615-623.
- [5] Bernal-Vicente A., Ros M., Pascual. 2012. Inoculation of *Trechoderma harzianum* during maturation of vineyard waste compost to control muskmelon *Fusarium* wilt. *Bioresources.* 7 (2): 1948-1960.
- [6] Blaya J., Marhuenda F. C., Pascual J.A., Ros M. 2016. Microbiota Characterization of Compost Using Omics Approaches Opens New Perspectives for *Phytophthora* Root Rot Control. *Plos One.* DOI: 10.1371/journal.pone.0158048