



ETSIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica

# Proceedings of the 6<sup>th</sup> WORKSHOP ON AGRI-FOOD RESEARCH



WIA:17



Universidad Politécnica de Cartagena



6th Workshop on Agri-food Research-WiA.16. Cartagena, Murcia, Spain. 8-9 May 2017

# Proceedings of the 6<sup>th</sup> WORKSHOP ON AGRI-FOOD RESEARCH

## **Editores y Comité Científico Organizador**

**Dr. Francisco Artés-Hernández (Convener)**

**Dr. José Enrique Cos**

**Dr. Juan A. Fernández-Hernández**

**Dr. Javier Calatrava**

**Dra. Encarna Aguayo**

**Dr. Juan José Alarcón**

**Dr. Marcos Egea Gutiérrez-Cortines**

Doctorate Program in Advanced Techniques for Research and Development in Food and Agriculture (TAIDA). Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica (ETSIA). Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT)  
<http://taidaa.upct.es/>

## Acknowledgements

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

© 2018, Francisco Artés-Hernández, José Enrique Cos , Juan Antonio Fernández-Hernández, Javier Calatrava, Encarna Aguayo, Juan José Alarcón y Marcos Egea Gutiérrez-Cortines, (editores y comité organizador)

© 2018, Programa de doctorado en Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario. TAIDA, UPCT. <http://taidaa.upct.es/>

© 2018, Universidad Politécnica de Cartagena.

CRAI Biblioteca  
Plaza del Hospital, 1  
30202 Cartagena  
[ediciones@upct.es](mailto:ediciones@upct.es)

Primera edición, 2018  
ISBN: 978-84-16325-64-1

© Imagen de la cubierta: elaboración del autor



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

## **Preface**

As Convener of the Organizing and Scientific Committee of the 6<sup>th</sup> Workshop on Agri-Food Research (WIA.17) and Coordinator of the Doctoral Program in Advanced Techniques for Research and Development in Food and Agriculture (TAIDA), I am very proud to see in this proceedings book the excellent presentations conducted by PhD candidates of our Program. Presentations showed a great scientific interest and reflect the high potential of the Research Groups that belong to the several departments and institutions integrated into our PhD Program (UPCT, CEBAS-CSIC, and IMIDA). We expect that during the celebration of this Workshop, the coexistence and exchange of ideas and experiences among PhD candidates, research groups, researchers, technicians, etc.. has been favored.

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

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

**Francisco Artés-Hernández PhD**

**Convener of the 6<sup>th</sup> Workshop on Agri-Food Research (WIA.17)**

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

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

The WIA 2017 has been very interesting due to the high scientific quality of the results presented, and the preparation and commitment of the PhD students that have participated in it. Additionally, there have been three keynote lectures that have provided an excellent example to the students on how to present top-level scientific knowledge.

These Proceedings summarise the scientific contributions presented and they illustrate the excellent level of the 2017 Workshop, allowing the dissemination of its major achievements.

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

**Pablo Fernández-Escámez PhD**

**Director of the International Doctoral School**

**Universidad Politécnica de Cartagena**

## Organizers



Universidad  
Politécnica  
de Cartagena



## Collaborators



# INDEX

## KEYNOTE SPEAKERS

### PRIMA (Partnership for Research and Innovation in the Mediterranean Area)

D.S. Intrigliolo *	11
--------------------	----

### Reasons to publish the scientific work

A. Martínez *	12
---------------	----

### A modular cloning toolbox of programmable DNA-binding proteins for plant genome engineering

D. Orzaez *	13
-------------	----

## ORAL SESSION I: Food Technology and Engineering

### Effect of different thermal treatments on the antioxidant capacity of a pea puree

T. V. Klug*, E. Collado, A. Martínez-Sánchez, P. A. Gómez, E. Aguayo, F. Artés, F. Artés-Hernández	15
--	----

### Quality changes of fresh and then microwaved minimally processed faba seeds

E. Collado*, T.V. Klug, F. Artés-Hernández, E. Aguayo, A. Martínez-Sánchez, F. Artés, P. A. Gómez	19
---	----

### Phenolic and antioxidant compounds changes of algae based smoothies during shelf life

N. Castillejo*, G.B. Martínez-Hernández, P.A. Gómez, E. Aguayo, F. Artés, F. Artés-Hernández	23
--	----

### Gene expression and volatile production during melon ripening

M. Zarid*, C. Esteras, A. Gemma Sifres, X. Cañizares, J. Esteva, M. Belén Picó, A.J. Monforte, J.P. Fernández Trujillo	27
--	----

### Controlling green mould rot of lemons by means of ultraviolet-C irradiation

M.A. Parra*, J.A. Martínez	31
----------------------------	----

### Functionality of a watermelon juice enriched in L-citrulline in athletes of a half-marathon race

B. Fernández-Lobato*, A. Martínez-Sánchez, E. Aguayo	35
--	----

### Modification in the phenylpropanoid metabolism induced by the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans* in chilli pepper CM334

N. López-Martínez*, J.P. Fernández-Trujillo, M. Biesaga, E. Zavaleta-Mejía	39
--	----

### Effect of microwave thermal treatment and stress conditions (acid shock) on *Listeria monocytogenes* in food

J.A. Sotomayor-Ballesta*, A. Iguaz-Gaínza, P.M. Periago-Bayonas	43
---	----

### Effect of substrate on parameters of thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*

G.A. González-Tejedor*, F. Artés-Hernández, P.S. Fernández	47
--	----

## ORAL SESSION II: Agroforestry and Economy Engineering

### Agronomical aspects of desalinated seawater for crop irrigation in the Segura River Basin (south-eastern Spain)

M.J. González-Ortega*, V. Martínez-Álvarez, M. Soto-García	52
--	----

### Financial assessment of the restoration and maintenance of the Historic Garden "El Huerto de las Bolas"

S. Gómez*, P. Satoca, F.J. Alcón.....	56
<b>Sensitivity to the Priestley-Taylor coefficient in the estimation of crop ET by remote sensing</b>	
J. A. Martínez-Pérez*, S. García-Galiano, A. Baille.....	60
<b>Implementation and evaluation of a wireless vision node for water management in agriculture</b>	
J.M. González-Esquivá*, G. García-Mateos, A. Ruiz-Canales, J.M. Molina-Martínez.....	64
<b>ORAL SESSION III: Plant Production Technology and Engineering</b>	
<b>Assessment of the combined use of MSW and autochthonous tree species for the phytomanagement of mine wastes under semiarid climate</b>	
D. Martínez-Oró*, I. Párraga-Aguado, H.M. Conesa.....	69
<b>Evaluation of the heritability in emamectin benzoate resistance of <i>Orius laevigatus</i> (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae)</b>	
V. Balanza*, J.E. Mendoza, P. Bielza.....	73
<b>Heritability and response to selection for non-prey feeding tolerance in <i>Orius laevigatus</i> (Fieber)</b>	
J. E. Mendoza*, V. Balanza, P. Bielza.....	77
<b>Assessment of plant water indicators for regulated deficit irrigation management in sweet cherry</b>	
V. Blanco*, P.J. Blaya-Ros, A. Pérez-Pastor, R. Domingo.....	81
<b>Selection of a <i>Tuta absoluta</i> population (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) resistant to chlorantraniliprole</b>	
L. García-Vidal*, M.R. Martínez-Aguirre, P. Bielza.....	85
<b>Resistance to neonicotinoids in Spanish populations of <i>Myzus persicae</i> (Hemiptera: Aphididae)</b>	
A. Belando*, I. Moreno, C. Grávalos, P. Bielza.....	89
<b>Evolution of <i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius) resistance to cyantraniliprole in 2016 and 2017</b>	
I. Moreno*, A. Belando, C. Grávalos, P. Bielza.....	93
<b>Effects of Biosolarization with fresh sheep manure on soil physical properties of pepper greenhouses in Campo de Cartagena</b>	
P. Fernández*, A. Lacasa, P. Guirao, S. Larregla.....	97
<b>ABA-overproduction response under salinity</b>	
A. Martínez-Pérez*, A. Ferrández-Ayela, A.B. Sánchez-García, A. Albacete, Z. Kevei, L. Estellés, F. Mohareb, A. Thompson, M. Gifford, J.M. Pérez-Pérez, F. Pérez-Alfocea, C. Martínez-Andújar <sup>1</sup> .....	101
<b>Assessment of fruit quality of grapefruit at postharvest influenced by reclaimed water and deficit irrigation</b>	
C. Romero-Trigueros*, P.A. Nortes, M. Parra, J.M. Bayona, J.J. Alarcón, E. Nicolás.....	105
<b>A new approach to ascertain the sensitivity to water stress of different plant water indicators</b>	
J.M. De la Rosa*, MR. Conesa-Saura, R. Domingo, C. Castillo, A. Temnani, A. Pérez-Pastor.....	109
<b>Damping effect of rootstocks on pepper plants against saline stress</b>	
A. Gálvez*, J. López-Marín.....	113
<b>Rootstock modify the productive response of 'Verna' lemon under regulated deficit irrigation</b>	
J. M. Robles*, J.G. Pérez-Pérez, P. Botía.....	117



## ORAL SESSION IV: Agrifood Biotechnology

### Analysis of growth kinetics of *Petunia sp.* using a computer vision based phenotyping system

F. Pérez-Sanz\*, J. Weiss, P.J. Navarro-Lorente, M. Egea-Cortines..... 122

### Structure of the leaf and petal circadian clock in petunia

M.I. Terry\*, M. Egea, J. Weiss..... 126

### Peach breeding (*Prunus persica* L.): Agronomic evaluation of selections IMIDA – NOVAMED: Siroco 30°, Siroco 40° y Siroco 43°

A. Guevara\*, A. Carrillo, F. García, D. López, M.B. Lopez, J. Cos. .... 130

### Pepino mosaic virus RNA-Dependent RNA Polymerase POL Domain Is a Hypersensitive Response-Like Elicitor Shared by Necrotic and Mild Isolate

R. Sempere, C. Gómez-Aix, F. Ruíz-Ramón\*, P. Gómez, B. Hasiów-Jaroszewska, M. Sánchez-Pina, and M. Aranda ..... 134

### Morphological and agronomical characterization of local accessions of cowpea in South Eastern Spain

M. Martos-Fuentes\*, C. Egea-Gilabert, J.Weiss, M. Egea-Cortines, J.A. Fernández ..... 138

### Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Petunia* for gene silencing using Kanamycin as the selection agent

C. Brandoli\*, C. Petri-Serrano, J. Weiss ..... 142

### Levels of stress markers in populations of *Pinus halepensis* growing in different mine tailings

A. López-Orenes\*, M.A. Ferrer, A.A. Calderón ..... 146

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

A. Martínez-Bas\*, M. Kessler, J.J. Marín, E. Armero..... 150

### Effect of illumination during the *in vitro* multiplication of *Limonium sinuatum*

J. Sánchez\*, A.A. Calderón ..... 154

## POSTER SESSION I: Food Technology and Engineering

### The anti-biofilm activity of essential oils against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis

M. Somrani\*, H. Debbabi, F. Abidi, A. Palop ..... 159

### Optimization of packaging and refrigerated preservation of fresh sea bream (*Sparus aurata*) from aquaculture, intact and in fillets

L. Navarro-Segura\*, M. Ros-Chumillas, A. López-Gómez ..... 163

### New biotechnological processes for manufacturing scFOS in the liquid sugar industry

M.J. Sánchez-Martínez\*, S. Soto-Jover, A. López-Gómez ..... 167

### New cardboard active tray based on nanoencapsulated essential oils in $\beta$ -cyclodextrins. Optimization of the industrial manufacturing process

J. Grande-Finch\*, A. Iguaz-Gainza, A. López-Gómez ..... 171

## **POSTER SESSION II: Agroforestry and Economy Engineering**

### **Energy consumption and greenhouse gas emissions of two lettuce production systems**

M.A. Martínez-Maté\*, B. Martín-Górriz, J.F. Maestre-Valero ..... 176

### **Improvements in the control of table olive pitting, slicing and stuffing machines**

A. Lucas-Pascual\*, A. Madueño-Luna, A. Ruiz-Canales, J. M. Molina Martínez ..... 180

### **Analysis of the performance of the feeding chain in olive pitting machines by artificial vision and neural networks**

M. de Jódar\*, A. Madueño-Luna, A. Ruiz-Canales, J. M. Molina-Martínez ..... 184

### **Design of the first prototype of an equipment for irrigation management using weighing lysimetry (LP1)**

J.A. Nicolás-Cuevas\*, D. Parras-Burgos, Leandro Ruiz-Peñalver, J.M. Molina-Martínez..... 188

## **POSTER SESSION III: Plant Production Technology and Engineering**

### **Use of suppressive compost and their biological extracts to produce quality and sustainable baby leaf lettuce in soil and in tray system**

A. Giménez\*, J.A. Fernández, C. Egea-Gilabert, J.A. Pascual ..... 193

### **Geographic Information System and Remote Sensing applied to the estimation of the plant water status**

C. Castillo\*, J.M. de la Rosa, A. Pérez-Pastor ..... 197

### **Alternative water management strategies and his impact on the soil biology quality in semiarid agroecosystem**

J. Abadía\*, F. Bastida, E. Nicolás ..... 201

## **POSTER SESSION IV: Agrifood Biotechnology**

### **Fructiculture of the Region of Murcia and climate change perspectives**

J. M. Martín-Balsalobre\*, J. Cos-Terrer ..... 206



# Keynote speakers

## PRIMA (Partnership for Research and Innovation in the Mediterranean Area)

## PRIMA (Asociación para la Investigación e Innovación en el Área Mediterránea)

D.S. Intrigliolo\*

Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, Dept. Riego Campus Universitario Espinardo, Ed. 25, 30100, Murcia, España

\*dintri@cebas.csic.es

### **Abstract**

PRIMA is a Research and Innovation programme to be developed as an article 185 within Horizon 2020 whose vision is strengthening Euro-Mediterranean cooperation to support inclusive well-being and socio-economic development in Euro-Mediterranean societies. PRIMA promotes research and innovation across 3 thematic areas: 1) Sustainable management of water for arid and semi-arid Mediterranean areas, 2) Sustainable farming systems under Mediterranean environmental constraints and 3) Mediterranean food value chain for regional and local development. PRIMA relies on an 'Open Innovation, Open Science and Open to the World' approach, based on the active involvement of all components of the so-called Quadruple Helix (Universities and Research Centres, Small and Medium Enterprises -SMEs- and Large Industry, Government and Public Sector, and User Community and Lead Users), and the joint consideration of environmental, technical and socio-economic aspects. The programme presents a long-term orientation, and aims at avoiding fragmentation and duplications in R&I activities. It will be implemented by a new and autonomous implementing structure, and will have a total budget of about 650 M€ for 10 years. PRIMA will have the participation of Countries from the three Continents around the Mediterranean rim according to principles of equal footing, mutual interest, shared benefits and co-funding.

**Keywords:** agriculture; article 185; food systems; water.

### **Resumen**

PRIMA es un programa de Investigación y Desarrollo que se está desarrollando como un artículo 185 dentro del Horizonte 2020 y cuya visión es fortalecer la cooperación Euro-Mediterránea para promover el desarrollo socio-económico y el bienestar en las sociedades Euro-Mediterráneas. PRIMA promueve la investigación e innovación en torno a 3 pilares: 1) Manejo sostenible del agua para áreas Mediterráneas áridas y semiáridas, 2) Sistemas agrarios sostenibles bajo las restricciones medioambientales del Mediterráneo, 3) Cadena de valor de los alimentos Mediterráneos para el desarrollo regional y local. PRIMA es una aproximación de 'Innovación Abierta, Ciencia Abierta y Abierta al Mundo', basada en la implicación activa de todos los actores de la denominada Cuádruple Hélice. El Programa presenta una orientación a largo plazo, y pretende evitar la fragmentación y las duplicaciones en actividades de I+D. Tendrá un presupuesto disponible para I+D de unos 650 M€ para 10 años. Se pondrá en marcha mediante una nueva y autónoma estructura de implantación, que garantizará la integración científica, financiación y gestión entre iniciativas. La característica más importante de PRIMA es la participación de países de los tres continentes con territorios en el Mediterráneo, respetando los principios de igualdad, interés mutuo, beneficios compartidos y cofinanciación.

**Palabras clave:** agricultura; artículo 185; agua; sistemas alimentarios.

## Reasons to publish the scientific work

## Porque publicar el trabajo científico

A. Martínez\*

Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC). Catedrático Agustín Escardino 7, 46980, Paterna, Valencia, Spain.

\*amartinez@iata.csic.es

### **Abstract**

One of the functions of Critical Science, to publish, is to be an open window to the world of scientists. This window shows how we interact with society or governments, and also how we do science, how we should do it and what things we could improve. There are many practical reasons why we have to publish our work. Two seem obvious: 1. Prove to the funding agencies that we actually did something with the money we were given. 2. Show our organization that we are doing something worthwhile with all the time we have, when we are not teaching. We could add other reasons to publish: 1. Often, you really do not understand what you've discovered until you write it down. 2. When an article is submitted for publication, peer reviews are received. These revisions can often be very useful as they sometimes point to errors or deficiencies in their logic. 3. When you publish your results, you become part of the scientific community. With this, we benefit from the exchange of ideas and learn about what others have already done. Valuable collaborations can often be made with people working on the other side of the globe. If everyone keeps their results and ideas secret, the progress of science would slow down. If we want to benefit from the work that others have done before we should contribute sharing our work and results.

**Keywords:** Research; Diffusion; Journals.

### **Resumen**

Una de las funciones de la Ciencia Crítica, publicar, es ser una ventana abierta al mundo de los científicos. Esta ventana quiere mostrar cómo interactuamos con la sociedad o los gobiernos, y también cómo hacemos ciencia, como deberíamos hacerla y qué cosas podríamos mejorar. Hay muchas razones prácticas por las que tenemos que publicar nuestro trabajo. Dos parecen obvias: 1. Probar a las agencias que financian la investigación que realmente hicimos algo con el dinero que se nos dio. 2. Mostrar a nuestra organización que estamos haciendo algo que vale la pena con todo el tiempo que tenemos cuando no estamos enseñando. Podríamos añadir algunas otras razones convincentes para publicar: 1. A menudo, realmente no entiendes lo que has descubierto hasta que se escribe. 2. Cuando se somete un artículo para la publicación, se reciben revisiones de colegas. Estas revisiones a menudo pueden ser muy útiles ya que a veces señalan errores o deficiencias en su lógica. 3. Cuando se publican los resultados, uno se convierte en parte de la comunidad científica. Con ello, nos beneficiamos del intercambio de ideas y aprendemos sobre lo que otros ya han hecho. A menudo se puede establecer colaboraciones valiosas con personas que trabajan al otro lado del planeta. Si todo el mundo mantiene sus resultados e ideas en secreto, el progreso de la ciencia se ralentizaría. Si deseamos beneficiarnos del trabajo que otros han hecho antes, es justo que contribuyamos también con nuestra parte

**Palabras clave:** Investigación; Difusión; Revistas.

## A modular cloning toolbox of programmable DNA-binding proteins for plant genome engineering

## Herramientas de clonaje modular para ingeniería multigénica y edición genómica en plantas

D. Orzaez\*

IBMCP-CSIC, Avda Tarongers SN, 46022 Valencia, Spain.

\*dorzaez@ibmcp.upv.es.

### **Abstract**

**GoldenBraid (GB) is a modular DNA assembly tool for multigene engineering and Synthetic Biology in plants. The last GB version, introduces a number new features, the most relevant being the possibility to incorporate experiments to the GB database. This option was introduced to enable the association of functional specifications to the description of GB3.0 elements. Other important novelties are the improvement of domestication tools, the design of descriptive datasheets, or the inclusion of a special section dedicated to the design of CRISPR/Cas9 constructs for genome engineering. We will show how the combination of multigene engineering with the multiplexing capacity of CRISPR/Cas9 opens new possibilities for plant breeding. We will also show how modular cloning facilitates de design of artificial transcriptional regulators based on CRISPR/Cas9 architecture.**

**Keywords:** Multigene engineering; CRISPR/Cas9; GoldenBraid; Plant Synthetic Biology.

### **Resumen**

**GoldenBraid (GB) es una herramienta de ensamblaje modular de ADN para la ingeniería multigénica y la biología sintética en plantas. La última versión GB, GB3.0, introduce nuevas características como la posibilidad de incorporar datos experimentales a la base de datos GB. Esta opción fue introducida para permitir la asociación de especificaciones funcionales a la descripción las piezas genéticas. Otras novedades importantes son la mejora de las herramientas de domesticación, el diseño de hojas de datos descriptivos o la inclusión de una sección especial dedicada al diseño de construcciones CRISPR/Cas9 para la edición genómica de plantas. Mostraremos cómo la combinación de la ingeniería multigénica con la capacidad de multiplexación de CRISPR/Cas9 abre nuevas posibilidades para la mejora vegetal. También mostraremos cómo el clonaje modular facilita el diseño de reguladores transcripcionales artificiales basados en la arquitectura CRISPR /Cas9**

**Palabras clave:** Ingeniería mutigénica; CRISPR/Cas9; GoldenBraid; Biología Sintética de Plantas.



# ORAL SESSION I: Food Technology and Engineering

## Effect of different thermal treatments on the antioxidant capacity of a pea puree

## Efecto de diferentes tratamientos térmicos en la capacidad antioxidante de un puré de guisantes

T. V. Klug<sup>1\*</sup>, E. Collado<sup>2</sup>, A. Martínez-Sánchez<sup>1,2</sup>, P. A. Gómez<sup>2</sup>, E. Aguayo<sup>1,2</sup>, F. Artés<sup>1,2</sup>, F. Artés-Hernández<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Postharvest & Refrigeration Group. Food Engineering Department. Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT), Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena, Spain.

<sup>2</sup> Institute of Plant Biotechnology (IBV). UPCT. Campus Muralla del Mar, s/n. 30202 Cartagena, Spain.

\* tammilaklug@gmail.com

### **Abstract**

**Legume puree development under eco-innovative technologies is an interesting market. Consumers are demanding appetizing, healthy ready-to-eat products due to a desire for a healthier lifestyle. The present study evaluates the total antioxidant capacity (TAC) of two different assays (DPPH and FRAP) of a pea puree throughout 24 days of storage at 5 °C. Peas were treated with steam (5 min, 80°C) or continuous microwave (MW) flow (9 kW, 40s) before being blended in a food processor (3 min, 3000 rpm) to obtain a consistent puree and then vacuum packed. Control (CTRL) samples consisted on fresh blended peas in a food processor (3 min, 3000 rpm) at room temperature and vacuum packaged. The TAC of the pea puree, evaluated in both FRAP and DPPH assays studied increased, especially after MW treatment. This trend was observed at the end of the storage, reporting differences with to steam and CTRL treatments in relation to DPPH assay. The lowest TAC was observed in CTRL puree samples. These results determined that MW heating of pea seeds is an appropriate technique to improve the quality of a pea puree.**

**Keywords:** *Pisum sativum*; minimal processing; microwave; sustainable techniques.

### **Resumen**

**Los purés de legumbres desarrollados bajo tecnologías eco-innovadoras son un mercado interesante, ya que los consumidores están demandando productos saludables listos para consumo debido al estilo de vida. El presente estudio evalúa la capacidad antioxidante total (TAC) por dos métodos diferentes (DPPH y FRAP) de un puré de guisantes durante 24 días a 5 °C. Los guisantes se trataron con vapor (5 min, 80 °C) o en un horno microondas (MW) semindustrial de flujo continuo (9 kW, 40 s), antes de ser triturados en un procesador (3 min, 3000 rpm) para obtener un puré consistente. Posteriormente se envasaron al vacío. El Control (CTRL) consistió en guisantes frescos triturados en el procesador (3 min, 3000 rpm) a temperatura ambiente y envasado al vacío. El TAC del puré de guisantes evaluado por FRAP y DPPH aumentó especialmente después del tratamiento con MW. Esta tendencia se observó hasta al final del almacenamiento, con diferencias en los tratamientos con vapor y CTRL en relación al ensayo de DPPH. La menor capacidad antioxidante se observó en muestras CTRL de puré. Estos resultados apuntan el calentamiento MW en las semillas de guisantes, como una técnica adecuada para mejorar la calidad del puré de guisantes.**

**Palabras clave:** *Pisum sativum*; procesado mínimo; microondas; técnicas sostenibles.



## 1. INTRODUCTION

Consumers are showing new interest in functional and healthy food and increasing the demand for ready to eat products due to their lifestyle. Peas are legumes with an important source of protein (ca. 24%), vitamins and minerals for diet [1]. Furthermore, a vital phenolic content and antioxidant activity in pea seeds have been previously reported [2] as well as positive associations between increased intake of legumes and health [3]. The development of 'ready-to-eat' pea puree is an alternative, which would help to increase the intake of legumes by consumers at different population segments.

In order to satisfy the current consumers demands, it is necessary to process technologies which can guarantee safety and stability and also offer high quality products [4]. Heating of food products by using continuous flow microwave systems (MW) is a technology considered an interesting alternative to conventional techniques that have been shown to provide preservation of bioactive compounds [5]. In addition it offers rapid and relatively uniform heating, reduced space utilization and precise process control [6]. On the whole, MW blanching would benefit the industry by decreasing energy costs.

The aim of the present study was to evaluate the impact of MW and steam thermal processing on the total antioxidant capacity (TAC) evaluated by two different assays (DPPH and FRAP) of a ready-to-eat pea puree throughout 24 days of storage at 5 °C

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Plant Material

The puree formulation was constituted by peas (*Pisum sativum L*) from an open field crop, hand-picked and immediately transported to the laboratory of the Universidad Politécnica de Cartagena (Murcia, Spain). Upon arrival they were kept in darkness at 5°C. The next day, the plant material was peeled and immature seeds were immersed in cold water. After that, they were sanitized by immersion in NaClO (100 mg.L<sup>-1</sup>, pH 6.5) before processing.

### 2.2 Processing treatments and storage conditions

Sanitized pea seeds samples (100 g) were packed in polyethylene bags to MW pasteurization treatment with an innovative semi-industrial prototype of continuous MW oven (SI-MAQ0101, Sairem Ibérica SL, Barcelona, Spain). Based on our preliminary studies, appropriate combination of temperature/ time of 9 kW / 40 s was selected. Alternatively, pea seeds (100 g) were treated with steam (5 min) produced by a domestic Thermomix cooking. In both steam and MW processing the final temperature in all treatments was 85 ± 4 °C. After both kinds of pasteurization, samples were blended in a 3,7 L processor Robot Cook® (Robot Coupe, Montceau-en-Bourgogne, France) for 3 min at 1.450 g-1 and subsequently samples of puree (100 g) were packed in polyethylene bags embossed and vacuum sealed (Egarvac, Barcelona, Spain) rapidly cooled (5°C) with an ice-water bath. Control samples consisted of fresh peas blended in food processor (3 min, 1.450 g-1) at room temperature and then vacuum packed. All samples were stored at 5°C in darkness and analyzed at day 0, 7, 15 and 24 of storage at 5°C. Three duplicates per treatment and sampling day were evaluated.

### 2.3 Total Antioxidant Capacity

The antioxidant capacity (TAC) was determined by DPPH and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays [7, 8] and was expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) per 100 g<sup>-1</sup> fw.

## 2.4 Statistical analysis

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

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

The antioxidant capacity (TAC) of pea puree evaluated by FRAP and DPPH assays is presented in the Figures 1 and 2. TAC evaluated by DPPH assay at day 0, in pea puree samples, showed values around  $26.18 \pm 2.41$ ,  $53.21 \pm 0.44$  and  $47.38 \pm 4.72$  mg TAEC  $100 \text{ g}^{-1}$  fw to CTRL, MW and STEAM treatments, respectively. MW treatment significantly ( $p < 0.05$ ) increased the TAC evaluated by DPPH assay in respect to CTRL and STEAM treated samples during 24 days of storage at  $5^\circ\text{C}$  (Fig. 1). At the end of the storage, MW treated samples showed losses of 16% regarding values on processing day, while STEAM treated samples showed losses of 22% (Fig. 1).

In relation to TAC evaluated by FRAP assay, CTRL, MW and STEAM treatments, values of  $18.87 \pm 1.04$ ,  $49.25 \pm 3.04$  and  $34.34 \pm 1.04$  mg TEAC  $100 \text{ g}^{-1}$  fw, were shown, at day 0, where MW treatment showed significant differences in relation to other treatments (Fig. 2). On the other hand, Mitra et al., (2017) [9] reported TAC losses of 6% after MW treatment (3150 W, 150s) in tomato puree in relation to untreated samples. After 7 days of storage at  $5^\circ\text{C}$ , there were no significant differences in MW and STEAM samples treated (Fig. 2). This trend was observed until the end of the storage.

The lowest antioxidant capacity was observed in CTRL puree samples in both assays studied (FRAP and DPPH). Thermal treatments (MW and STEAM) applied in the pea seeds avoided TAC losses of the pea puree during storage probably due to the heat inactivation of enzymes involved in the degradation of antioxidant compounds or because of softening or disruption of plant cell walls and the destruction of complex phenolics [10].

## 4. CONCLUSIONS

As main conclusion, it has been found that a pea puree with nutritional quality can be produced by an innovative processing technique such as continuous MW, since total antioxidant capacity by FRAP and DPPH assay were improved.

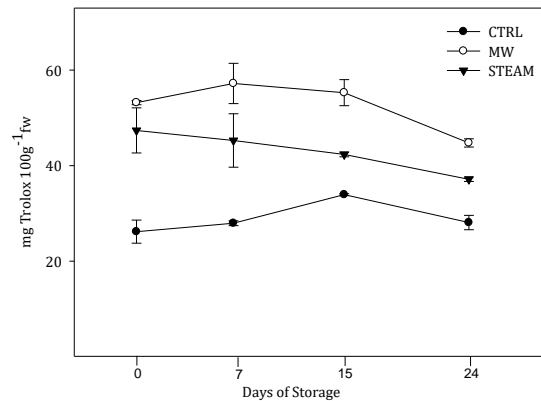
## 5. ACKNOWLEDGMENTS

Authors are grateful to EUROLEGUME Project N<sup>o</sup> 613,781 funded by European Union under the 7<sup>th</sup> Framework Programme for Research, Technological Development and Dissemination. The authors also express gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) of Brazil for a grant support to Tâmmila Venzke Klug.

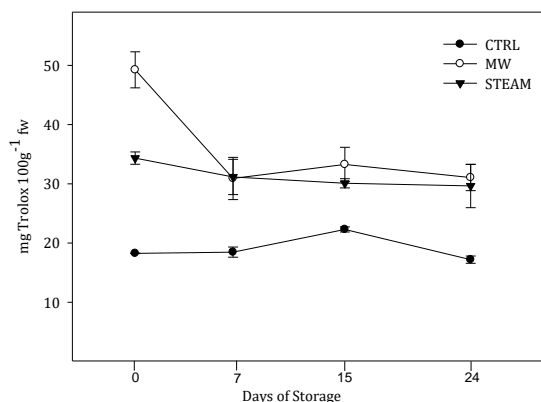
## 6. REFERENCES

- [1] Dahl W.J., Foster L.M., Tyler R.T. 2012. Review of the health benefits of peas (*Pisum sativum* L.). Br J Nutr. 108: S3-S10
- [2] Stanisavljević N.S., Ilić M.D., Matić I.Z., Jovanović Z.S., Čupić T., Dabić D.C., Natić M.M., Tešić Z.Lj. 2016. Identification of Phenolic Compounds from Seed Coats of Differently Colored European Varieties of Pea (*Pisum sativum* L.) and Characterization of Their Antioxidant and In Vitro Anticancer Activities. Nutr Cancer. 68: 988-1000.

- [3] Lima, A.I.G., Mota J., Monteiro S.A.V.S., Ferreira R.M.S.B. 2016. Legume seeds and colorectal cancer revisited: Protease inhibitors reduce MMP-9 activity and colon cancer cell migration. *Food Chem.* 197: 30-38.
- [4] Picouet P.A., Landl A., Abadías M., Castellari M., Viñas I. 2009. Minimal processing of a Granny Smith apple purée by microwave heating. *Innov Food Sci Emerg Tech.* 10: 545-550.
- [5] Benlloch-Tinoco M., Igual M., Rodrigo D., Martínez-Navarrete N. 2015. Superiority of microwaves over conventional heating to preserve shelf-life and quality of kiwifruit puree. *Food Control.* 50: 620-629.
- [6] Puligundla P., Abdullah S.A., Choi W., Jun S., Oh S., Ko S. 2013. Potentials of microwave heating technology for select food processing applications: a brief overview and update. *J Food Process Technol.* 4: 1-9.
- [7] Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Tech.* 28: 25-30.
- [8] Benzie I.F., Strain J.J. 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Method Enzymol.* 299:15-27.
- [9] Arjmandi M., Otón M., Artés F., Artés-Hernández F., Gómez P.A., Aguayo E. 2017. Microwave flow and conventional heating effects on the physicochemical properties, bioactive compounds and enzymatic activity of tomato puree. *J Sci Food Agr.* 97: 984-990.
- [10] Bernhardt S., Schlich E. 2005. Impact of different cooking methods on food quality: retention of lipophilic vitamins in fresh and frozen vegetables. *J Food Eng.* 17: 327-333.



**Figure 1:** Total antioxidant capacity by DPPH assay of pea puree samples treated by Control (CTRL), Microwave (MW) and Steam storage at 5 °C up to 24 days.



**Figure 2:** Total antioxidant capacity by FRAP assay of pea puree samples treated by Control (CTRL), Microwave (MW) and Steam storage at 5 °C up to 24 days.

## Quality changes of fresh and then microwaved minimally processed faba seeds

## Cambios en la calidad de semillas de haba mínimamente procesadas y microondas

E. Collado<sup>1\*</sup>, T.V. Klug<sup>1,2</sup>, F. Artés-Hernández<sup>1,2</sup>, E. Aguayo<sup>1,2</sup>, A. Martínez-Sánchez<sup>1,2</sup>, F. Artés<sup>1,2</sup>, P. A. Gómez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Plant Biotechnology. Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). Campus Muralla del Mar. 30202. Cartagena, Spain.

<sup>2</sup>Postharvest and Refrigeration Group. Department of Food Engineering. Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). P<sup>o</sup>. Alfonso XIII, 48. 30203. Cartagena, Spain.

\*elenacolladomarin@hotmail.com

### **Abstract**

**Faba seeds (*Vicia faba* L.) are one of the most common legumes, rich in proteins, carbohydrates, antioxidants, fiber, vitamins and minerals. Therefore, the production of minimally processed immature faba seeds would be an alternative to promote its consumption. In addition, that product can be microwaved if packaged in an appropriate package. The effects of sanitation with NaOCl (150 ppm, pH 6.5) or alternatively NaOCl + a sucroester edible coating (Naturcover<sup>®</sup> P, NAT) or UV-C light (3 kJ m<sup>-2</sup>, UV) on sensory attributes (overall quality, taste, aroma, visual appearance, texture, browning, dehydration and brightness) and evolution of tannins, an antinutritional factor, on fresh and microwaved faba beans were analyzed. NAT or UV treatments allowed a shelf life of 10 days at 4°C while 7 days were possible for NaOCl treated fresh seeds stored in passive modified atmosphere. UV was effective to decrease tannins concentration. On the other hand, microwaving also decreased the tannins amount for all the treatments and allowed to obtain a product of high quality.**

**Keywords:** *Vicia faba* L.; microwave; edible coating; NaOCl; UV-C.

### **Resumen**

**Las habas (*Vicia faba*) son una de las leguminosas más comunes, fuente de proteínas, carbohidratos, antioxidantes, fibra, vitaminas y minerales. Por ello, la producción de semillas de habas inmaduras mínimamente procesadas sería una alternativa para promover su consumo. Además, este producto podría cocinarse en microondas si se envasa en un envase apropiado. En este estudio se analizaron los efectos de la desinfección con NaOCl (150 ppm, pH 6,5) o alternativamente con NaOCl + un recubrimiento comestible de ésteres de azúcar (Naturcover<sup>®</sup> P, NAT) o con luz UV-C (3 kJ m<sup>-2</sup>, UV) sobre la calidad sensorial (aspecto general, aroma, apariencia, textura, pardeamiento, deshidratación y pérdida de brillo) y la evolución de taninos, un factor anti-nutricional, en habas frescas y microondas (1 min, 700 W). Los tratamientos NAT y UV permitieron que las semillas mínimamente procesadas y envasadas en atmósfera modificada pasiva llegaran a una vida útil de 10 días a 4°C, la que fue de 7 días para las tratadas con NaOCl. UV mostró un efecto positivo en la reducción de los taninos. La cocción con microondas redujo los taninos y mantuvo la calidad de las semillas obteniéndose un producto de alta calidad.**

**Palabras clave:** *Vicia faba* L.; microondas; recubrimiento comestible; NaOCl; UV-C.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las habas (*Vicia faba* L.) destacan por su alto contenido de proteínas, la presencia de carbohidratos de asimilación lenta, minerales (Ca, Fe, Zn), fibra (soluble) y algunos componentes bioactivos. Su consumo ayuda en la prevención de enfermedades crónicas como diabetes, hipercolesterolemia, diferentes cardiopatías y cáncer [1], si bien contienen algunos compuestos anti-nutricionales, como los taninos, que pueden limitar su ingesta [2]. Para fomentar el consumo, una de las soluciones que se plantean es el desarrollo de productos mínimamente procesados (“IV gama”), listos para consumir. Además, esta legumbre puede ser cocinada en microondas en envases apropiados, obteniendo un alimento nutritivo y de calidad en poco tiempo.

Por otro lado, la desinfección es uno de los pasos más críticos en la elaboración de productos de IV gama. La industria utilizada ampliamente el hipoclorito de sodio (NaOCl) por su actividad antimicrobiana y su bajo coste [3]. Sin embargo, es cuestionado debido a la formación de subproductos tóxicos. Como alternativa, la desinfección por radiación UV-C podría ser eficaz [3]. Además, las películas o revestimientos antimicrobianos comestibles pueden mejorar la calidad, la seguridad, la vida útil y la funcionalidad de los productos alimenticios.

El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos del lavado con NaOCl (100 ppm, pH 6,5) o alternativamente con NaOCl más un recubrimiento comestible (NAT) o el tratamiento con luz UV-C (UV) y envasado en atmósfera modificada pasiva, sobre la calidad organoléptica y el contenido de taninos de semillas de habas frescas almacenadas durante 10 días a 4°C y luego microondas.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Procesado, envasado, almacenaje y microondado

El material vegetal (habas var. *Palenca*) se recolectó en febrero de 2016. Las muestras se transportaron refrigeradas al laboratorio, manteniéndose en oscuridad (1°C, 90-95% HR). Al día siguiente se pelaron manualmente en una sala desinfectada y climatizada (8°C), manteniendo las semillas en agua fría (4°C) hasta aplicar los tratamientos de desinfección: (1) inmersión durante 2 min en NaOCl (150 ppm, pH 6.5) y enjuague con agua fría durante 1 min; (2) inmersión durante 2 min en NaOCl (150 ppm, pH 6.5), enjuague con agua fría durante 1 min e inmersión durante 2 min en un éster de sacarosa (Naturcover® P, NAT), dilución 1:10; (3) aplicación de luz UV-C (UV) (3 kJ m<sup>-2</sup>). Se envasaron en bolsas (125 g, 15x15 cm) de OPP (50 µm φ), se termosellaron y se almacenaron a 4°C. Tanto al inicio como a los 3, 7 y 10 días las muestras fueron microondas en el mismo envase (1 min, 700 W) después de realizar 4 perforaciones de 1 mm φ. Se prepararon 8 repeticiones por tratamiento y día de evaluación.

### 2.2 Evaluación sensorial

Se efectuó mediante un panel de 7 personas (de 24 a 50 años) entrenadas de acuerdo con las normas internacionales (ASTM STP 913 1986). Se usó una escala hedónica de 9 puntos para pardeamiento, pérdida de brillo y deshidratación (9=ausencia, 5=presencia moderada, 1=presencia severa) y también para el resto de parámetros: aspecto visual, sabor, aroma, textura y calidad general (1=no comestible; 5=límite comercial; 9=excelente).

### 2.3 Análisis de taninos

Se utilizó el método de Price et al. [4] con modificaciones. Los resultados se expresaron en mg de catequina eq. 100 g<sup>-1</sup> de peso fresco (pf) Se analizaron 3 muestras para habas frescas y microondas, respectivamente.

### 2.4. Análisis estadístico

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

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Evaluación sensorial

Durante el almacenamiento se observó una disminución de la calidad sensorial (Fig. 1), tanto en muestras frescas como en microondas. A los 10 d, las semillas tratadas con NAT y UV mostraron mayor calidad general y apariencia visual que las de NaOCl, que estaban por debajo del límite de comercialización. Resultados similares se dieron para el aroma, donde las muestras de NaOCl tuvieron peores valores (datos no mostrados). La textura (datos no mostrados) y el sabor disminuyeron también, en este caso sin diferencias entre tratamientos. Para las procesadas en microondas, las muestras de NaOCl cocinadas a los 10 d estuvieron por debajo del límite comercial. El pardeamiento aumentó con el tiempo, independientemente de los tratamientos, con las muestras de NaOCl a día 10 bajo el límite, no así las tratadas con UV y NAT. En general, las tratadas con NaOCl mostraron una vida útil reducida (7 d) con respecto a las de UV o NAT (10 d). Los resultados coinciden con trabajos previos que muestran el efecto positivo de UV y NAT en hortalizas como el brócoli [5, 6]. Por otra parte, el cocinado con microondas en cada una de las salidas de conservación en fresco, no redujo las características sensoriales.

#### 3.2 Taninos

El contenido de taninos disminuyó durante el almacenamiento, tanto en el producto fresco como microondado, excepto al final para las muestras cocinadas con microondas (días 7 y 10), en que se mantuvo constante (Fig. 2). Las semillas frescas mostraron mayor contenido de taninos, con reducciones al día 0 después del cocinado de  $\cong 30\%$ ,  $56\%$  y  $60\%$  en las muestras tratadas con NAT, UV y NaOCl, respectivamente. La luz UV fue la que más redujo los taninos, tanto en muestras frescas como microondas. En cambio, las muestras de NAT mostraron siempre el mayor contenido. Estos resultados coinciden con estudios previos en otras leguminosas donde el cocinado disminuyó el contenido de taninos [7]. Esto puede deberse a que estos compuestos son termolábiles [8]. El mayor contenido en las muestras NAT, frescas o microondas, puede deberse a que el recubrimiento evitaría la oxidación de estos compuestos, aspecto aún no confirmado.

### 4. CONCLUSIONES

El uso de UV-C o de NaOCl + Naturcover<sup>®</sup> podría ser una alternativa al NaOCl, pues mejora la calidad sensorial de las habas mínimamente procesadas y prolongan su vida útil a 4°C. En relación a los taninos, el uso de UV-C fue el más eficiente para disminuir su concentración. El cocinado con microondas también lo disminuyó, sin afectar la calidad sensorial. La combinación de procesado mínimo y cocción en microondas es una opción viable para la comercialización.

### 5. AGRADECIMIENTOS

A la financiación por parte del Proyecto EUROLEGUME, Fondos de la Unión Europea, 7<sup>º</sup> Programa Marco de Investigación, Desarrollo Tecnológico y Diseminación, Acuerdo N<sup>º</sup> 613781.

### 6. REFERENCIAS

[1] Chuang S.C., Norat T., Murphy N., Olsen A., Tjønneland A. 2012. Fiber intake and total and cause-specific mortality in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. *Am. J. Clin. Nutr.* 96: 164-174.

[2] Goyoaga C., Burbano C., Cuadrado C., Romero C., Guillamón E., Varela A., Pedrosa M.M., Muzquiz M. 2011. Content and distribution of protein, sugars and inositol phosphates during the germination and seedling growth of two cultivars of *Vicia faba*. *J. Food Comp. Anal.* 24: 391–397.

[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.

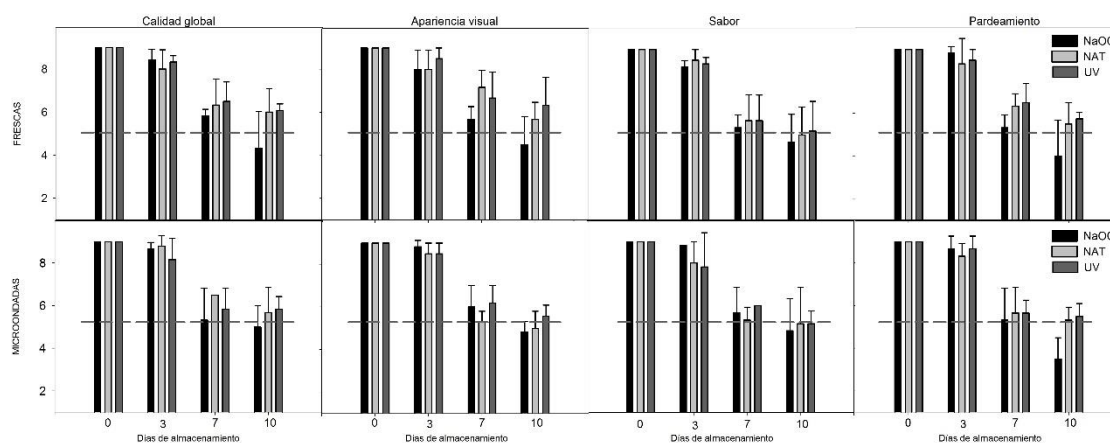
[4] Price M.L., Socoyoc S.V., Butler L. 1978. A certical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin on sorgum graim. *J. Agric. Food Cgem.* 26:1214-1218.

[5] Costa L., Vicente A.R., Civello P.M., Chaves A.R., Martínez G.A, 2006. UV-C treatment delays postharvest senescence in broccoli florets. *Postharv Biol Techn.* 39: 204-210.

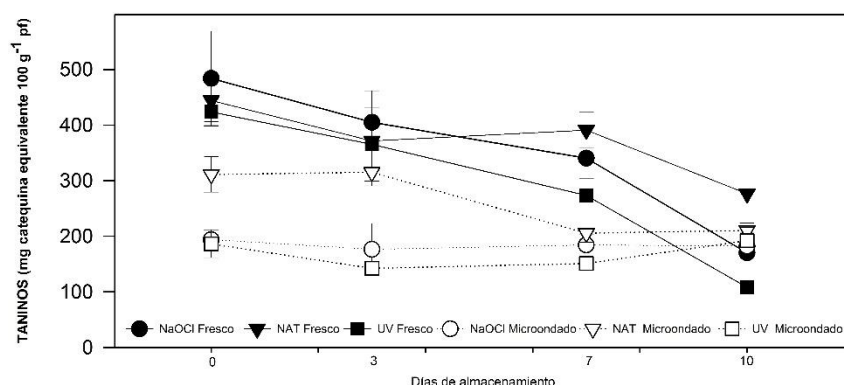
[6] Navarro-Rico J., Martínez-Hernández G.B., Artés F., Artés-Hernández F., Gómez P.A. 2015. Effect of edible coatings and electrolyzed water sanitation on fresh-cut 'bimi' broccoli quality. *Acta Hort.* 1071: 463-470.

[7] Xu Y., Cartier A., Obielodan M., Jordan K., Hairston T., Shannon A., Sismour E. 2016. Nutritional and anti-nutritional composition, and in vitro protein digestibility of Kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) as affected by differential processing methods. *Food Measure.* 10: 625–63.

[8] Khattab R.Y., Arntfield S.D. 2009. Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments 2. Antinutritional factors. *Food Sci. Technol.* 42: 113-118.



**Figura 1.** Efecto de distintos tratamientos de desinfección en fresco sobre la calidad sensorial de habas almacenadas en atmósfera modificada durante 10 días a 4°C y luego microondadas.



**Figura 2.** Efecto de distintos tratamientos de desinfección en fresco sobre el contenido de taninos en habas almacenadas en atmósfera modificada durante 10 días a 4°C y luego microondadas (las barras verticales representan la desviación estándar).

## Phenolic and antioxidant compounds changes of algae based smoothies during shelf life

## Evolución de compuestos fenólicos y antioxidantes en batidos a base de algas durante su vida comercial

N. Castillejo<sup>1\*</sup>, G.B. Martínez-Hernández<sup>1,2</sup>, P.A. Gómez<sup>2</sup>, E. Aguayo<sup>1,2</sup>, F. Artés<sup>1,2</sup>, F. Artés-Hernández<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología Vegetal, UPCT, Cartagena, Murcia, Spain.

\*noelia.castillejo@upct.es

### **Abstract**

Many vegetable smoothies are commonly a rich source of vitamins, folates, glucosinolates polyphenols, antioxidants, and minerals, among others, which can complement the diet if ingredients are properly chosen. Algae are rich in polyphenols and antioxidants that have biological activity. In this work the levels of polyphenols and antioxidants of 3 green smoothies based on table grape (56.5%), cucumber (25.8%) and Bimi broccoli (15.5%), two of them with algae (2.2%) and one used as Control are reported. After 24 days of storage at 5°C, it was found that the smoothie with Dulse algae had a higher phenols content (72.82 mg chlorogenic acid equivalent 100 g<sup>-1</sup> fw) than Control (64.53 mg chlorogenic acid equivalent 100 g<sup>-1</sup> fw), while in the smoothie with Irish Moss algae it was similar than in Control. No differences in the antioxidant capacity between Control and Dulse smoothies (about 30 mg trolox equivalent 100 g<sup>-1</sup> fw) were found while Irish Moss smoothie showed a lower content (11.87 mg trolox equivalent 100 g<sup>-1</sup> fw). Therefore, the addition of Dulse algae to a green smoothie lead to an increase in bioactive compounds, which is very interesting as a diet complement.

**Keywords:** functional beverage; seaweed macroalgae; bioactive compounds; cold storage.

### **Resumen**

Los batidos vegetales son una fuente rica de vitaminas, folatos, glucosinolatos, polifenoles, antioxidantes y minerales, entre otros, que complementan la dieta si se eligen bien sus ingredientes. Las algas son ricas en polifenoles y antioxidantes con actividad biológica. En este trabajo se presentan los resultados de polifenoles y antioxidantes de 3 batidos verdes a base de uva (56,5%), pepino (25,8%) y brócoli Bimi (15,5%), dos de ellos con alga (2,2%) y uno Control. Tras 24 días de conservación a 5°C, el batido con alga Dulse tuvo un mayor contenido en fenoles (72,82 mg equivalente de ácido clorogénico 100 g<sup>-1</sup> pf) que el Control (64.53 mg equivalente de ácido clorogénico 100 g<sup>-1</sup> pf), mientras que el batido con Musgo de Irlanda fue similar al Control. No se encontraron diferencias significativas en la capacidad antioxidante entre el batido Control y con Dulse (30,87 y 29,02 mg trolox equivalent 100 g<sup>-1</sup> pf) mientras que en el batido con Musgo de Irlanda el contenido fue menor (11,87 mg trolox equivalent 100 g<sup>-1</sup> fw). Por tanto, la adición del alga Dulse al batido indujo un aumento de compuestos bioactivos muy interesante como complemento para la dieta.

**Palabras clave:** bebidas funcionales; macroalgas; compuestos bioactivos; conservación refrigerada.



## 1. INTRODUCCIÓN

Los consumidores demandan progresivamente alimentos más sanos, nutritivos, seguros, respetuosos con el medio ambiente y listos para el consumo debido a los actuales hábitos alimentarios y ritmo de vida [1,2]. Los batidos vegetales se suelen definir como bebidas no alcohólicas preparadas a partir de frutas y/u hortalizas que son trituradas sin filtrar y normalmente mezcladas con hielo para ser consumidas en el momento [3]. Muchos de ellos son buena fuente de compuestos con actividad biológica e interés nutricional como vitaminas C y E, folatos, glucosinolatos, polifenoles y otros antioxidantes y minerales, entre otros [4]. Las macroalgas marinas han formado parte de la dieta de países del Este durante siglos [5] y son una fuente de nutrientes muy importante, por lo que se puede incorporar a los batidos como un ingrediente funcional [6,7]. El objetivo de este trabajo fue determinar la evolución de los compuestos bioactivos en un batido de hortalizas durante 25 días de conservación refrigerada y el efecto de añadirle dos tipos de algas.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

Tras varios desarrollos y formulaciones se seleccionó un batido con la siguiente composición: 56,5% uva, 25,8% pepino, 15,5% brócoli Bimi y 2,2% alga. Se utilizaron las algas: Musgo de Irlanda y Dulse. La composición del batido Control, sin alga, fue 57,8% uva, 26,4% pepino y 15,8% brócoli Bimi. Las frutas y hortalizas utilizadas se lavaron con agua de la red con 100 ppm de NaClO. Se pesaron las cantidades necesarias y se homogeneizó en un Robot Cook (Robot Coupe, Vincennes Cedex, Francia). Una vez preparado el batido se almacenó en tubos Falcon de 50 mL protegidos de la luz para facilitar la extracción de producto en las correspondientes salidas posteriores sin contaminar al resto del batido almacenado. Todos los batidos se conservaron a 5°C, sin tratamiento térmico, con 3 repeticiones por cada batido y día de análisis.

### 2.2 Polifenoles totales

Se pesó 1 g de la muestra congelada en tubos Falcon y se le añadieron 4 mL de metanol (MeOH). Se agitaron durante 1 h a 200 G en una caja de poliestireno con hielo picado en un agitador orbital (Stuart, Staffordshire, Reino Unido) en la oscuridad. Seguidamente los tubos se centrifugaron a 15.000 G (4°C, 10 min). El contenido en fenoles totales se determinó a partir del método de Singleton y Rossi [8] con algunas modificaciones. Se dispusieron 40 µL en una placa de poliestireno de 96 pocillos (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Alemania) a los que se añadieron 15 µL de Folin-Ciocalteu 2 N. Esta mezcla se dejó 3 min incubando a temperatura ambiente y en la oscuridad. Terminada la incubación se añadieron 190 µL de una disolución que contenía Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,4%) y NaOH (2%) y se dejaron reaccionar durante 1 h en oscuridad y a temperatura ambiente, tras lo que se midió la absorbancia a 750 nm con un lector de placas multiscan (Tecan Infininte M200, Männedorf, Suiza). El contenido en fenoles totales se expresó como equivalentes de ácido clorogénico por 100 g<sup>-1</sup> de muestra fresca. Todos los extractos se analizaron por triplicado.

### 2.3 Capacidad antioxidante total

La capacidad antioxidante total (CAT) se determinó por el método FRAP [9]. La extracción fue la misma que para los fenoles totales. Se tomaron 15 µL del sobrenadante que se dispusieron en una placa, justo después se añadieron 220 µL de la disolución buffer y se dejó reaccionar durante 1 h en la oscuridad a temperatura ambiente. La medida se tomó a 593 nm usando el arriba citado lector de placas multiscan. Los resultados se expresaron en equivalentes de trolox por 100 g de muestra fresca. Todos los extractos se analizaron por triplicado.

#### 2.4. Análisis estadístico

El análisis de la varianza (ANOVA) se realizó comparando el tipo de batido y el tiempo de conservación usando el paquete estadístico Statgraphics Plus software (vs. 5.1, Statpoint Technologies Inc., Warrenton, USA). Las diferencias estadísticas se valoraron a un nivel de significación de  $P \leq 0.05$ , y se usó el test de Tukey de rango múltiple para la separación de medias.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El batido con el alga Dulse destacó por su alto contenido en fenoles totales con respecto al del Musgo de Irlanda y el CTRL (Fig. 1). Al añadir Dulse aumentó un 44,6% ese contenido mientras entre los otros dos batidos no hubo diferencias significativas. El contenido en fenoles se mantuvo constante durante la conservación en el batido con Dulse, excepto en los días 3 y 7 que se produjo una disminución del 25,4 y 15,7% respectivamente, respecto al CTRL. La tendencia ascendente del batido CTRL y del batido con Musgo de Irlanda es muy similar, produciéndose un aumento en el día 24 con respecto al inicial del 34,3 y 34,9% respectivamente. No se observan diferencias significativas entre ambos batidos. El incremento del contenido de fenoles puede deberse a la mayor disponibilidad de los compuestos tras la degradación del producto durante su conservación. Según Machu et al. [10] cuando estudiaron el contenido de fenoles en diferentes algas, Dulse presentó la mayor concentración (10 mg ácido gálico  $g^{-1}$  GAE).

La capacidad antioxidante total en el día inicial fue mayor en el batido CTRL y en el de Dulse (30,87 y 29,02 mg trolox equivalentes  $100 g^{-1}$  pf) que en el de Musgo de Irlanda (11,87 mg trolox equivalentes  $100 g^{-1}$  pf). Se observan fluctuaciones durante la conservación de los batidos, destacando en el día 7 una disminución en el CTRL y Dulse del 70,6 y 71,8% respectivamente (Fig. 2). Los resultados obtenidos tras 24 días no presentan diferencias significativas con los datos iniciales.

### 4. CONCLUSIONES

El batido verde elaborado con el alga Dulse destacó por su mayor contenido de fenoles respecto al CTRL y al batido con Musgo de Irlanda. De igual forma, este último batido presentó un alto contenido de capacidad antioxidante similar al CTRL. Por tanto, la adición de Dulse al batido indujo un aumento de compuestos bioactivos muy interesante como complemento para la dieta.

### 5. AGRADECIMIENTOS

Se agradece la financiación del Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2013-48830-C2-1-R), de SAKATA SEED IBÉRICA S.L.U. y a los fondos FEDER de la UE.

### 6. REFERENCIAS

- [1] Artés-Hernández, F., Aguayo, E., Gómez, P.A., Artés, F. 2009. Innovaciones Tecnológicas para preservar la calidad de los productos vegetales mínimamente procesados o de la “cuarta gama”. *Horticultura Internacional*. 69: 52-57.
- [2] Rodríguez-Verástegui, L.L., Martínez-Hernández, G.B., Castillejo, N., Gómez, P.A., Artés, F., Artés-Hernández, F. 2016. Bioactive compounds and enzymatic activity of red vegetable smoothies during storage. *Food Bioprocess Technol.* 9: 137-146.
- [3] Castillejo, N., Martínez-Hernández, G.B., Gómez, P.A., Artés, F., Artés-Hernández, F. 2016. Red fresh vegetables smoothies with extended shelf life as an innovative source of health-promoting compounds. *J. Food Sci. Technol.* 53: 1475-1486.

[4] Serrano, M., Zapata, P.J., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Valero, D. 2010. Antioxidant and nutritive constituents during sweet pepper development and ripening are enhanced by nitrophenolate treatments. *Food Chem.* 118, 497–503.

[5] Nwosu, F., Morris, J., Lund, V.A., Stewart, D., Ross, H.A. McDougall, G.J. 2011. Anti-proliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae. *Food Chem.* 126: 1006–1012.

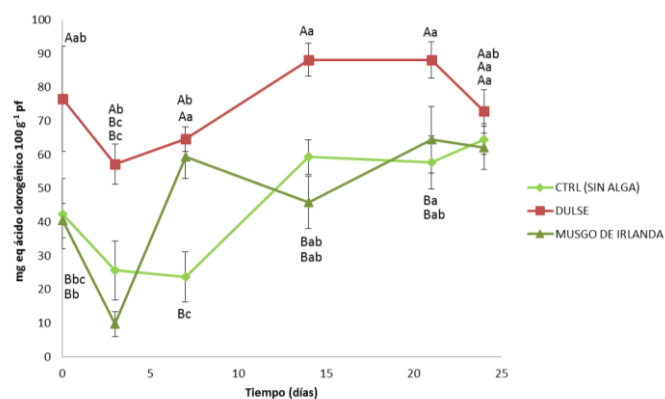
[6] Plaza, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E. 2008. In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends Food Sci. Technol.* 19: 31–39.

[7] Wang, T. Jónsdóttir, R., Kristinsson, H.G., Hreggvidsson, G.O., Jónsson, J.O., Thorkelsson, G., Ólafsdóttir, G. 2010. Enzyme-enhanced extraction of antioxidant ingredients from red algae *Palmaria palmata*. *LWT – Food Sci. Technol.* 43: 1387–1393.

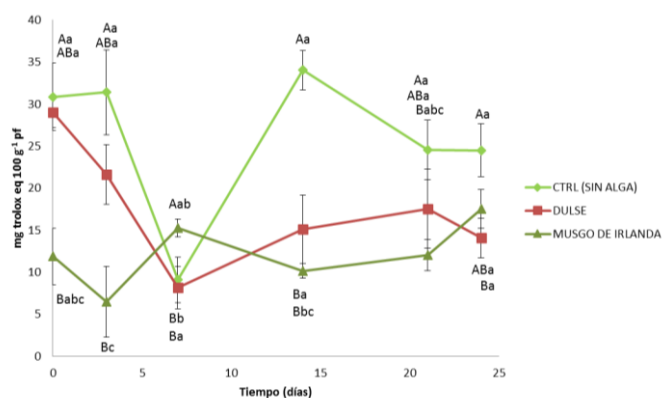
[8] Singleton, V.L., Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticul.* 16: 144–158.

[9] 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.

[10] Machu, L., Misurcova, L., Vavra Ambrozova, J., Orsavova, J., Mlcek, J., Sochor, J., Jurikova, T. 2015. Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. *Molecules.* 20: 1118–1133.



**Figura 1.** Contenido de fenoles totales en un batido sin alga (CTRL) y dos con alga (DULSE y MUSGO DE IRLANDA) almacenados durante 24 días a 5°C. Las letras mayúsculas diferentes denotan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre tratamientos para el mismo día de muestreo. Las letras minúsculas diferentes denotan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre los días de muestreo para el mismo tratamiento.



**Figura 2.** Capacidad antioxidante total en un batido sin alga (CTRL) y dos con alga (DULSE y MUSGO DE IRLANDA) almacenados durante 24 días a 5°C. Las letras mayúsculas diferentes denotan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre tratamientos para el mismo día de muestreo. Las letras minúsculas diferentes denotan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre los días de muestreo para el mismo tratamiento.

## Gene expression and volatile production during melon ripening

## Expresión génica y producción de volátiles durante la maduración del melón

M. Zarid<sup>1\*</sup>, C. Esteras<sup>2</sup>, A. Gemma Sifres<sup>2</sup>, X. Cañizares<sup>2</sup>, J. Esteva<sup>3</sup>, M. Belén Picó<sup>2</sup>, A.J. Monforte<sup>4</sup>, J.P. Fernández Trujillo<sup>1, 5</sup>

<sup>1</sup> Department of Agricultural & Food Engineering, Regional Campus of International Excellence “Campus Mare Nostrum” (CMN), Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). Paseo Alfonso XIII, 48, ETSIA. E-30203 Cartagena, Murcia, Spain.

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

<sup>3</sup> Department of Plant Production, ETSIA. CMN, UPCT, Cartagena, Murcia, Spain.

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

<sup>5</sup> Institute of Plant Biotechnology, CMN, UPCT, Cartagena, Murcia, Spain.

\*m.zarid@gmail.com

### **Abstract**

Transcriptome sequencing was performed in order to analyze the genes associated to volatile synthesis expressed during ripening and to understand the molecular mechanisms that differentiate a melon Near-isogenic Line (NIL) SC10-2 and its parental Piel de Sapo (PS). CmLOX18 gene (Similar to Lipoxygenase 18) was differentially expressed in the NIL SC10-2 compared with PS associated with the aroma volatile compound hexanal as a target compound of the non-climacteric ripening. The expression of CmACO1 (1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1) gene associated with ethylene biosynthesis did not change during ripening. The introgression in LG X was associated with the differential hexanal production of the NIL and PS. An eQTL located in LG X is probably controlling the production of aroma volatiles due to CmLOX18 in LG I.

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

### **Resumen**

Se realizó una secuenciación de transcriptoma para analizar los genes implicados en la formación de aromas expresados durante la maduración y para comprender los mecanismos moleculares que diferencian una línea casi isogénica (NIL) SC10-2 de melón y su parental Piel de Sapo (PS). El gen CmLOX18 (similar a la lipoxigenasa 4) se expresó diferencialmente comparando la NIL SC10-2 y PS y se asoció a la producción de hexanal, un compuesto diana e indicador del proceso de maduración no climatérica. La expresión del gen de la CmACO1 (1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1) implicado en la biosíntesis de etileno no manifestó diferencias durante la maduración. La introgresión en LG X estuvo asociada a la diferente producción de hexanal entre la NIL y PS. Se propone un eQTL en el LG X que controla la producción de aromas del gen CmLOX18 localizado en LG I.

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

## 1. INTRODUCTION

Melon is one of the most economically important fruit crops worldwide. LOX is an essential enzyme involved in the volatile biosynthetic pathways, and it is particularly regulated by ethylene during fruit ripening [1]. The near-isogenic line (NIL) SC10-2 has been studied previously due to its interest for improving melon flesh firmness associated with cell wall modifications compared with its “Piel de Sapo” (PS) parental [2]. Also, the NIL showed a late ripening compared with other non-climacteric melons producing differential aroma volatile profile and at harvest [3; 4]. The goal of this paper was to identify genes associated with aroma formation and delayed fruit ripening during postharvest ripening that may be involved in the differential behavior of SC10-2 compared with the recurrent PS.

## 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]. 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 plus a Tukey HSD test ( $p=0.01$ ) with interaction was performed to determine the effects of the pedigree (factor P) and the ripening time (factor t) on the aroma volatiles and gene expression using JMP 5.1 (Systat) and Statgraphics Plus for Windows 2.1 (Statistical Graphics Corp., Herndon, VA, USA).

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

We had more than 9850 sequences in our experience, and 1434 showing differential expression. Twenty one genes were identified for fruit ripening of which nine genes were expressed in SC10-2 and twelve in PS (only nine in common). Because of the differences in harvest time between lines were evident (data not shown), a gene associated with ripening and ethylene biosynthetic process was investigated known MELO3C014437 (*CmACO1*), LG V (Fig. 1B). However, no significant effects were found but one fruit of SC10-2 with showed a remarkably high ACO1 expression that is usually concomitant with high ester levels [4], ACO1 expression does not follow a normal distribution and mean and interaction were significant at  $P<0.1$ , which could be of interest. ACO1 gene, which regulated the last step of the biosynthetic pathway, can contribute to non-climacteric melon senescence or the biosynthesis of ethylene-dependent aroma volatiles [4]. Hexanal levels were consistently higher in SC10-2 over ripened fruits compared with the control PS (Figure 1A). Therefore levels of genes of the lipoxygenase (LOX) pathway were investigated. We only found the expression of the gene MELO3C024348 (*CmLOX18*), linkage group I (Fig. 1C). None of the other *CmLOX* genes reported by Zhang et al. (2014), particularly

*CmLOX1* and *CmLOX3* involved in the last stages of development and ripening, showed expression in our data. Other *CmLOx* are located in other LG's (one in LG X) though at least two of them associated with *CmLOX1* were not positioned any LG because of the lack of information in MELOGEN. Expression levels of *CmLOX18* showed no significant interaction but significantly higher levels in SC10-2 than in PS and convex quadratic changes over time were also significant ( $P=0.01$ ) with a similar trend in both lines (minimum after 8d of ripening). Among the roles associated with fruit ripening, LOX is involved in the generation of C6 alcohols and aldehydes such as hexanal, which constitute major volatile flavor components in ripening particularly of non-climacteric fruits [10]. In this experiment, *CmLOX18* expression preceded the upsurge of hexanal. For the same reason, when the level of volatile was very high the expression of the gene was diminishing (Figs. 1A and 1C). Environmental conditions and preharvest history of each fruit can affect the gene expression and production of volatile organic compounds [11]. Remarkably, *CmLOX18* expression markedly increased here as occurred with other *CmLOX* genes in strawberry [12], but also in climacteric fruit [13; 1], and in melon ripening [14]. The introgression of SC10-2 is located in homozygosity in whole LG X [4], but *CmLOX18* is only in LG I and its expression might be controlled by an expression QTL (eQTL) located in LG X that would have a contribution in differential hexanal production between SC10-2 and PS during ripening. Further research to verify the association between this e-QTL and ACO1 gene is required.

#### 4. CONCLUSIONS

The expression of *CmLOX18* gene located in LG I was associated with differential hexanal production linked to the introgression in LG X. An e-QTL located in LG X is proposed to partly modify the expression of *CmLOX18*.

#### 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), N. Dos-Santos, E. Cuadros, M. García-Gutiérrez, A. Hakmaoui (UPCT), M.J. Roca (SAIT-UPCT), and IRTA-CRAG for the seeds of the NIL.

#### 6. REFERENCES

- [1] Zhang B., Chen K., Bowen J., Allan A., Espley R., Karunairetnam S., Ferguson I. 2006. Differential expression within the LOX gene family in ripening kiwifruit. *J. Exp. Bot.* 57: 3825–3836.
- [2] Dos-Santos N., Jiménez-Araujo A., Rodríguez-Arcos R., Fernández-Trujillo J.P. 2011. Cell wall polysaccharides of near-isogenic lines of melon (*Cucumis melo* L.) and their inbred parentals which show differential flesh firmness and physiological behavior. *J. Agric. Food Chem.* 59:7773-7784.
- [3] Dos-Santos N., Bueso M.C, Fernández-Trujillo J.P. 2013. Aroma volatiles as biomarkers of textural differences at harvest in non-climacteric near-isogenic lines of melon. *Food Res. Int.* 54:1801-1812.
- [4] Escudero A.A., Zarid M., Bueso M.C., Fernández-Trujillo J.P. 2017. Aroma volatiles during non-climacteric melon ripening and potential association with flesh firmness. *Acta Hort.* (in press).
- [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.

In: Proc. IV Ibero-American Virtual Congress of Quality Management in Laboratory. May 2-June 30, 2007. Pp. 203-211. I.S.B.N 978-84-491-0796-2.

[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, Ziarolo 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 Agr.* 96: 2352-2365.

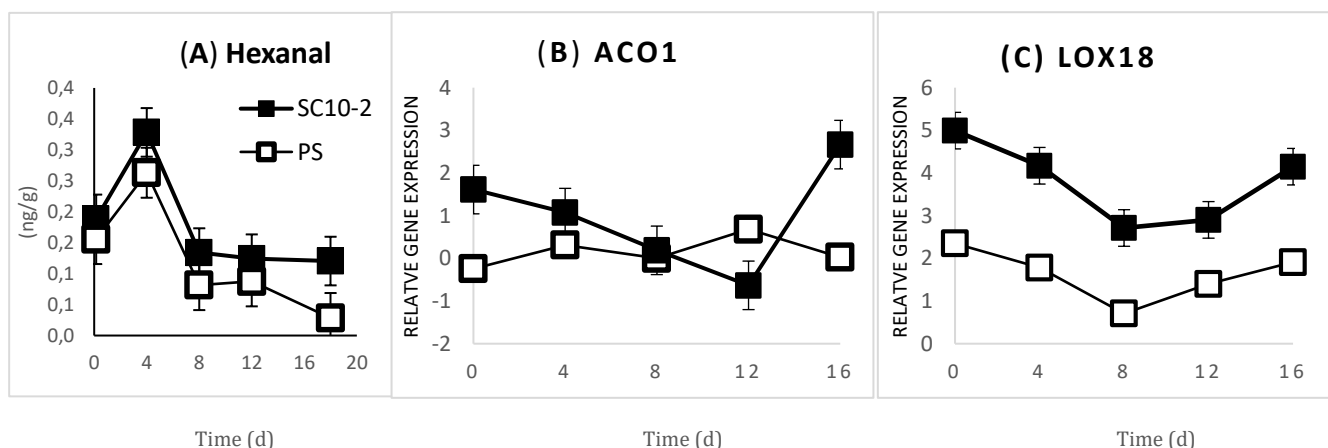
[10] Chen G.P., Hackett R., Walker D., Taylor A., Lin Z.F., Grierson D. 2004. Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (TomloxC) involved in the generation of fatty acid-derived flavor compounds. *Plant Physiol.* 136: 2641-2651.

[11] Zarid M., Fernández-Trujillo J.P. 2016. Seasonal effect on selected quality traits of a melon near-isogenic line. In: Proc. 5th Workshop Agri-Food Res. Eds.: F. Artés-Hernández, M. Egea-Cortines, J.A. Fernández-Hernández, J. Calatrava, E. Aguayo, J.J. Alarcón, J.E. Cos, eds. (CRAI Biblioteca. Universidad Politécnica de Cartagena, pp. 44-47) ISBN: 978-84-16325-29-0. 9-10/05/2016. <http://hdl.handle.net/10317/5558>.

[12] Pérez A.G., Sanz C., Olías, R., Olías J. 1999. Lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities in ripening strawberry fruits. *J. Agric. Food Chem.* 47: 249-253.

[13] Defilippi B.G., Kader A.A., Dandekar, A.M. 2005b. Apple aroma: Alcohol acyltransferase, a rate limiting step for ester biosynthesis, is regulated by ethylene. *Plant Sci.* 168, 1199-1210.

[14] Tang Y., Zhang C., Cao S., Wang X., Qi H. 2015. The effect of CmLOXs on the production of volatile organic compounds in four aroma types of melon (*Cucumis melo*). *PLoS ONE* 10(11):e0143567.



**Figure 1.** (A) Changes of hexanal present in melon aroma of the flesh during ripening at 20.5°C and 88% RH (mean ±SE, n=3). (B) Expression of the melon *CmACO1* gene of SC10-2 and its parental control PS. (C) *CmLOX18* gene expression over ripening of NIL SC10-2 and its parental control PS. (mean ± SE, n=3).

## Controlling green mould rot of lemons by means of ultraviolet-C irradiation

## Control de la podredumbre verde de limones por medio de la radiación ultravioleta-C

M.A. Parra<sup>1\*</sup>, J.A. Martínez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Protección de Cultivos. Dpto. Producción Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT), Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena, Spain.

\*ma.parra@upct.es

### **Abstract**

Green mould rot caused by *Penicillium digitatum* is the most important postharvest disease of lemon fruits in Spain causing more than 60% of total losses due to decay along the commercialization period. However, synthetic fungicides have been withdrawn from the market mainly due to selection of resistant fungal isolates and toxicity to humans and environment. The objective of this work consisted of evaluating the effect of ultraviolet-C illumination (UV-C) on the *in vitro* and *in vivo* growth of *P. digitatum* by means of evaluating the mycelial growth curves at 15°C and 85% RH for 10 days, then incidence and severity of decay were daily monitored. Mycelial growth rate decreased *in vitro* but not grown on irradiated fruits. In this case, UV-C reduced growth from the fifth day after irradiating whereas this reduction was immediately observed after inoculating fruits irradiated two days before. Results suggested that UV-C was mainly useful to reduce fungal growth mediated by some mechanism of inducible defence.

**Keywords:** *Penicillium digitatum*; mycelial growth rate; inducible defences.

### **Resumen**

La podredumbre verde ocasionada por *Penicillium digitatum* es la enfermedad poscosecha más importante de limones en España, siendo responsable de más del 60% de las podredumbres que afectan a este fruto. Sin embargo, el control de la enfermedad es difícil debido a la restricción al uso de fungicidas de síntesis y a la aparición de aislados resistentes a estos fungicidas. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar el efecto de la radiación ultravioleta-C (UV-C) sobre el crecimiento de *P. digitatum in vitro e in vivo*, estudiando las curvas del crecimiento del micelio a 15°C y 85% HR durante 10 días. Se evaluó diariamente la incidencia y severidad de la podredumbre. El crecimiento del hongo *in vitro* fue más lento cuando éste fue irradiado. Sin embargo, este efecto no se observó cuando el hongo fue irradiado en los frutos inoculados, excepto a partir del quinto día de radiación. El descenso de la tasa de crecimiento fue inmediato cuando los frutos fueron inoculados dos días después de la radiación. Estos resultados sugirieron que la UV-C actuó principalmente induciendo las defensas del fruto.

**Palabras clave:** *Penicillium digitatum*; crecimiento del micelio; inducción de defensas.



## 1. INTRODUCCIÓN

El limón es uno de los principales productos de la Región de Murcia, no estando exento de problemas durante su comercialización. La incidencia de enfermedades durante el almacenamiento es la mayor problemática de este producto, derivando en importantes pérdidas económicas comprendidas entre el 3 y el 6% [1]. Estas pérdidas son ocasionadas generalmente por los hongos *Penicillium digitatum* y *P. italicum*, causantes de las podredumbres verde y azul de limones, respectivamente. Sin embargo, el control de estas podredumbres es difícil debido a la aparición de resistencias y las restricciones al uso de fungicidas de síntesis impuestas fundamentalmente por la UE. Por ello, se está investigando activamente en métodos alternativos de control. Una de estas alternativas consiste en la aplicación de radiación UV-C, método físico de control que ya están utilizando algunas empresas hortofrutícolas para reducir la podredumbre de los frutos durante su comercialización. La radiación UV-C puede actuar ejerciendo un efecto germicida [2] y/o induciendo las defensas naturales de los frutos [3].

El objetivo del trabajo consistió en establecer el tipo de efecto de la radiación ultravioleta de alta energía (UV-C) contra *Penicillium digitatum* en limón, con el fin de valorar y optimizar la aplicación de este tratamiento en la mejora de la conservación de este producto.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal y origen del aislado de *Penicillium digitatum*

Los limones se cosecharon el 28 de enero en un huerto próximo a la cooperativa Campounión de Beniaján (Murcia). No se sometieron a ningún tratamiento previo tras la cosecha. Se trasladaron por transporte convencional al laboratorio de la UPCT donde se pre-almacenaron y desinfectaron, dando por comenzado el experimento el día 1 de febrero.

El aislado de *P. digitatum* procede de la colección de cultivos MAPYS (Microorganismos de la Agricultura, Poscosecha y Sostenibilidad). Las características de este aislado se describen en Parra y Martínez (2016) [4].

### 2.2 Aplicación de los tratamientos

Las experiencias *in vitro* se realizaron sembrando fragmentos del micelio del hongo obtenido a partir de un cultivo de 6 días, sobre medio sintético de agar de patata y dextrosa (PDA Scharlab®, Barcelona).

Para las experiencias *in vivo*, los frutos libres de defectos externos se lavaron con agua de abastecimiento y se desinfectaron con lejía comercial diluida al 4%. Se secaron y se establecieron los lotes. Se preparó una suspensión de conidios del aislado de *P. digitatum* y se ajustó la concentración a  $10^6$  conidios \* mL<sup>-1</sup>. Los frutos se inocularon con 10 µL de esta suspensión en una herida realizada con un punzón que alcanzó al albedo. Un grupo de frutos fueron irradiados con el hongo inoculado y el otro grupo se inoculó 2 días después de recibir la radiación. Los frutos se almacenaron en una cámara a 15°C y 85% HR.

El tratamiento aplicado consistió en irradiar las muestras con un equipo comercial de radiación UV-C instalado en la línea de producción de la empresa S.A.T. 9821 Grupo CFM de Fuente Álamo (Murcia). El equipo fue programado para irradiar 11 W \* m<sup>-2</sup>. Se establecieron 4 niveles de radiación: 0 (control), 10, 30 y 60 s de exposición, equivalente a una radiación total de 1, 3 y 6 kJ \* m<sup>-2</sup>.

### 2.3 Variables estudiadas

Previo a la inoculación del patógeno se midió el estado de madurez de los frutos de limón, aplicando los índices habituales [4]. Para la prueba *in vitro* se determinó diariamente el área de crecimiento de la colonia (cm<sup>2</sup>) de acuerdo con Parra y Martínez [4] y para la severidad de la

podredumbre desarrollada a partir de la inoculación de los frutos se consideró el radio de la podredumbre medido desde el punto de inoculación hasta el mismo borde, independientemente de la presencia o no de micelio.

#### 2.4 Tamaño de la muestra y análisis estadístico

En la experiencia *in vitro* se tomaron cuatro placas por tratamiento y los promedios de las áreas de las colonias se representaron en un gráfico XY o de dispersión junto con la desviación estándar como medida del error.

En el experimento *in vivo* se establecieron tres repeticiones por tratamiento (dosis de radiación), cada uno de ellas contenía 16 frutos. Se representó en un gráfico de dispersión el valor medio de la evolución del radio de la podredumbre desarrollada a intervalos diarios junto con la desviación estándar.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el experimento *in vitro* se apreció un ligero retardo del crecimiento del hongo irradiado que fue proporcional a la dosis de radiación recibida (Fig. 1a). La radiación no afectó a la latencia del hongo, puesto que en todos los casos el micelio empezó a emerger a partir del primer día tras la aplicación de la dosis radiactiva, incluido el control sin irradiar (Fig. 1a). Este efecto sobre el crecimiento puso de manifiesto el daño directo de la radiación sobre el crecimiento de las hifas del hongo que persistió durante 4 días a todas las dosis, desvaneciéndose proporcionalmente a la dosis aplicada. Sin embargo, no se pudo llegar a la misma conclusión cuando el hongo creció sobre los frutos inoculados. En este caso, la radiación no tuvo efecto sobre la germinación de los conidios ni en el crecimiento del micelio posterior (Fig. 1b). Sin embargo, pudo comprobarse un efecto de la radiación sobre el crecimiento del hongo a partir del 5<sup>o</sup> día de la aplicación, especialmente con la dosis de 30 s ( $3 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2}$ ). Este resultado sugiere, de forma indirecta, que se indujeron mecanismos de defensa contra el patógeno. Este hecho se pudo potenciar con la ejecución del experimento de irradiación de los frutos y posterior inoculación (Fig. 1c). En este caso, se obtuvo un efecto claro en la reducción del crecimiento del hongo desde el inicio del experimento, especialmente con la dosis de 30 s, mostrando que el efecto de la radiación sobre el crecimiento del micelio del hongo fue debido a un efecto indirecto que achacamos a la inducción de las defensas del fruto. En efecto, se ha documentado que la radiación ultravioleta aplicada a ciertas dosis induce las defensas de los frutos cítricos por medio de la activación de las actividades enzimáticas PAL y POD [5] y la inducción de fitoalexinas escoparona y escopoletina. [6].

### 4. CONCLUSIONES

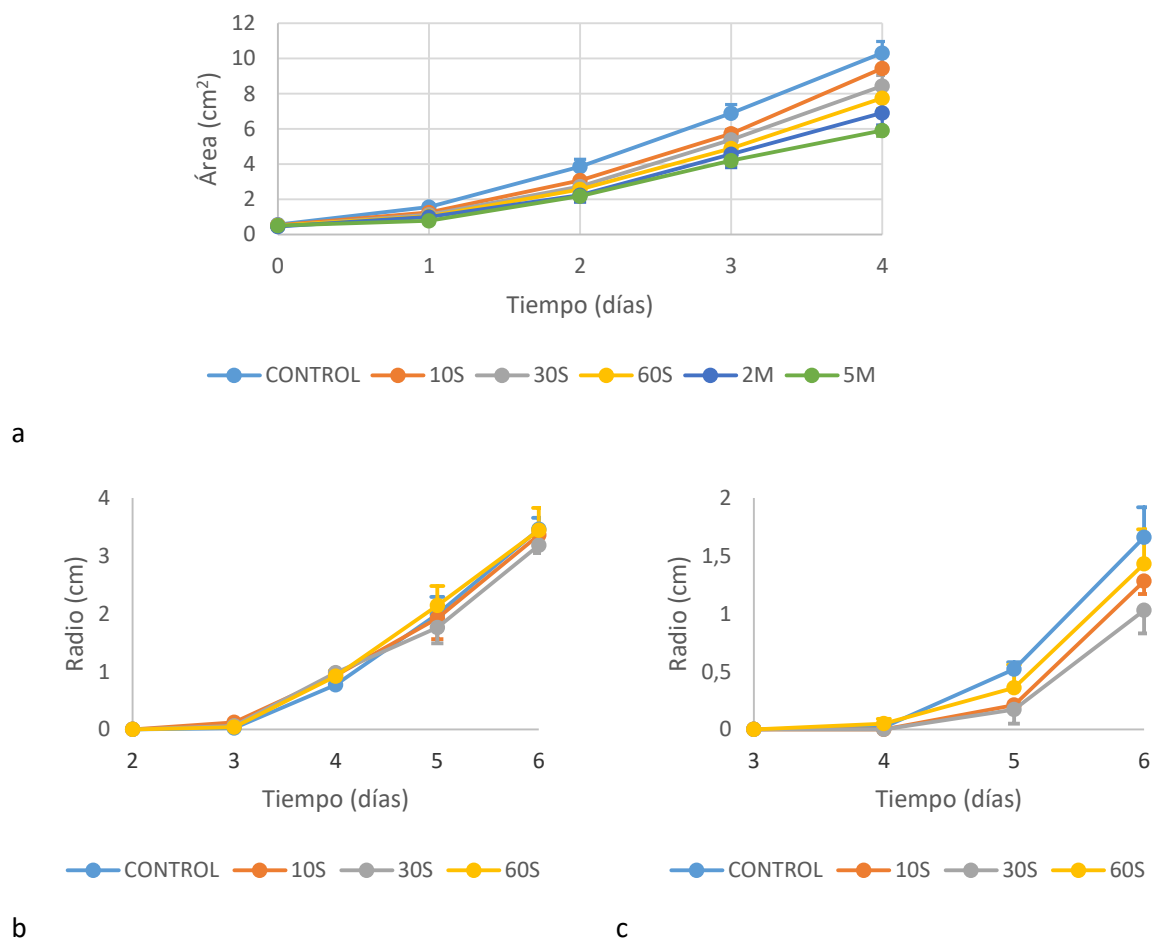
La radiación UV-C se mostró poco efectiva para causar daños en la germinación de conidios de *Penicillium digitatum* (datos no presentados) y para reducir el crecimiento del micelio del hongo. La desaceleración de la tasa de crecimiento de las hifas fue directamente proporcional a la dosis de radiación aplicada. Sin embargo, este efecto no se observó cuando el patógeno creció sobre los frutos causando podredumbre. Por el contrario, la reducción del crecimiento del hongo observada cuando creció sobre los frutos se debió básicamente a algún mecanismo de inducción de defensas.

### 5. AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro agradecimiento a la S.A.T. 9821 Grupo CFM de Fuente Álamo por el suministro del material vegetal y la financiación de este trabajo.

## 6. REFERENCIAS

- [1] Tuset J.J. 1987. Podredumbres de los Frutos Cítricos. Generalitat Valenciana. Conselleria D'Agricultura i Pesca, Valencia. 206 pp.
- [2] Haro-Mazo J.F., Guerrero-Beltrán J.A. 2013. Efectos de la radiación UV-C en frutas y verduras. Temas selectos de Ingeniería de Alimentos. 68-77.
- [3] Guerrero R.F., Puertas B., Jiménez M.J., Cacho J., Cantos-Villar E. 2010 Monitoring the process to obtain red wine quality loss. Food and Chem. 122: 195-202.
- [4] Parra, M.A., Martínez, J.A. 2017. Phenotypic variability and pathogenicity of different isolates of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* obtained from lemon fruits (*Citrus limon* (L.) Burm.) En: Proceedings of the 5<sup>th</sup> Workshop on Agri-Food research WiA-16. Editores: F. Artés-Hernández, J.A. Fernández-Hernández, J. Calatrava, E. Aguayo, J.J. Alarcón, J.E. Cos. Editorial: CRAI Biblioteca, Universidad Politécnica de Cartagena, Murcia, España. 130-133.
- [5] Barkai-Golan, R. 2001. Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables. Elsevier. 418 pp.
- [6] Charles, M.T., Arul, J. 2007. UV treatment of fresh fruits and vegetables for improved quality: A status report. Stewart Postharvest Review. 3-6.



**Figura 1.** Curvas de cinética de crecimiento de *Penicillium digitatum* tras irradiación con fuente de UV-C. [a] Limones inoculados e irradiados. [b] Limones inoculados dos días después de su radiación. [c] Crecimiento *in vitro* sobre PDA a 15°C.

## Functionality of a watermelon juice enriched in L-citrulline in athletes of a half-marathon race

## Funcionalidad de un zumo de sandía enriquecido en L-citrulina en deportistas de media maratón

B. Fernández-Lobato<sup>1,2\*</sup>, A. Martínez-Sánchez<sup>1,3</sup>, E. Aguayo<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Calidad y Salud, Instituto de Biotecnología Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT), España.

<sup>2</sup>Servicio de Farmacia. Hospital General Universitario Santa Lucía, Cartagena, España.

<sup>3</sup>Grupo de Postrecolección y Refrigeración. Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT).

\*babiferlo@gmail.com

### **Abstract**

Watermelon is a rich natural source of L-citrulline (CIT). This is a non-essential amino acid (aa) synthesized endogenously in the intestinal mucus. In recent years, L-cit has aroused a special interest in being a precursor of L-arginine biosynthesis, a substrate for the endogenous production of nitric oxide (NO), which has been attributed a positive effect on sports performance. In addition, L-cit is a metabolic intermediate to the hepatic urea cycle that contributes to the removal of the ammonium ion in the form of urea. The accumulation of ammonium has been related to the appearance of muscular fatigue and, therefore, with the decrease of the sporty performance. The aim of this study is to evaluate the influence of watermelon juice enriched in L-cit (ZSEC) on improving sports performance and recovering after a half-marathon. Subjective perception of the effort and of muscle pain and arginine and lactate in plasma were evaluated. As results, we found that after the race, volunteers who took ZSEC increased plasma arginine concentrations by 27% compared to placebo.

**Keywords:** Ergogenic aids; functional food; sport performance; muscle fatigue; nitric oxide.

### **Resumen**

La sandía es una fuente natural rica en L-citrulina (L-cit). Este aminoácido (aa) no esencial se sintetiza endógenamente en la mucosa intestinal. En los últimos años, L-cit ha despertado un especial interés por ser precursor de la biosíntesis de L-arginina, sustrato para la producción endógena de óxido nítrico (NO) al cual se le ha atribuido un efecto positivo en el rendimiento deportivo. Además, L-cit es un aa intermediario metabólico del ciclo de la urea hepático que contribuye a la eliminación del ión amonio en forma de urea. La acumulación de amonio ha sido relacionada con la aparición de la fatiga muscular y, por ello, con la disminución del rendimiento deportivo. El objetivo de este estudio consiste en evaluar la influencia del zumo de sandía enriquecido en L-cit (ZSEC) en la mejora del rendimiento deportivo y recuperación posterior, tras una media maratón. Con este fin, se determinó la percepción subjetiva del esfuerzo realizado al finalizar el ejercicio y la percepción subjetiva del dolor muscular al finalizar la carrera y a las 24, 48 y 72 horas post-carrera. Después de la carrera, los voluntarios que ingirieron ZSEC aumentaron las concentraciones plasmáticas de arginina un 27% respecto a placebo.

**Palabras clave:** Suplementos ergogénicos; alimento funcional; rendimiento deportivo; fatiga muscular; óxido nítrico.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los alimentos funcionales ejercen un efecto beneficioso sobre una o más funciones selectivas del organismo, además de sus efectos nutritivos intrínsecos, de modo que resulte apropiado para mejorar el estado de salud y bienestar, reducir el riesgo de enfermedad, o ambas cosas [1]. Además, sus efectos deben demostrarse en las cantidades normalmente consumidas en la dieta. La sandía es una fuente natural rica en L-cit, su riqueza puede variar desde 0,7 hasta 6 g/kg de peso fresco, presentando una mayor cantidad la corteza respecto a la pulpa [2-4]. L-cit es un aminoácido no esencial cuya degradación se produce en el riñón, de forma que el 83% de la citrulina plasmática se convierte en L-arginina [5]. Osowska et al. demostraron que la nutrición enteral en ratas enriquecida con L-cit (1g/kg/día), generaba altas cantidades de arginina en diversos tejidos [6]. La L-arginina, mediante la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), produce de forma endógena óxido nítrico (NO). El NO es un importante modulador del flujo sanguíneo, del metabolismo de la energía muscular, y de la respiración mitocondrial durante el ejercicio físico [7]. Por lo que los suplementos de NO pueden ser una ayuda ergogénica para aumentar el rendimiento deportivo [8].

Además, L-cit es un aminoácido intermediario metabólico del ciclo de la urea, cuya función es la eliminación del organismo del excedente del ión amonio en forma de urea [2]. Córdova et al. [9] demostraron que la suplementación con CIT a ciclistas semi-profesionales mejoraba el funcionamiento del ciclo de urea durante y después de un ejercicio físico intenso, facilitando la absorción energética de las proteínas; así como favoreciendo la síntesis de NO e incrementando la oxigenación del tejido hipóxico durante un periodo de tiempo prolongado. La acumulación del ión amonio activa la enzima fosfofructoquinasa y, con ello, se aumenta la tasa de glucólisis anaeróbica, bloqueando la utilización aeróbica de piruvato e impidiendo su reciclaje en la gluconeogénesis. Todo esto se traduce en la desviación del metabolismo energético hacia la producción y acumulación de lactato en tejidos musculares produciendo fatiga y dolor muscular [10].

Por todo lo expuesto, el objetivo principal de este estudio *in vivo* consistió en evaluar la funcionalidad de un zumo de sandía enriquecido en L-cit (ZSEC) en deportistas de media maratón. Para ello se evaluó el rendimiento deportivo, recuperación posterior y parámetros plasmáticos como arginina y lactato

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Bebidas

Se comparó un zumo de sandía enriquecido en L-cit (3,45 g por 500 mL) con respecto a una bebida placebo (PLA). Para la elaboración del zumo, se utilizó sandía de la variedad Fashion, por ser una de las variedades con mayor contenido en L-cit [11]. El enriquecimiento en L-cit se realizó de forma exógena añadiéndose a un zumo de sandía previamente elaborado y pasteurizado (ZSEC). Como PLA se elaboró una bebida con características organolépticas similares al zumo de sandía pero exenta de L-citrulina.

### 2.2 Diseño del estudio con voluntarios

En este estudio, se utilizó un diseño cruzado, doble ciego, aleatorizado, en el que cada voluntario actuaba a su vez como su propio control. Se seleccionaron 21 voluntarios varones corredores amateurs (edad:  $35,3 \pm 11,4$  años, altura:  $175,5 \pm 7,6$  cm, peso:  $73,6 \pm 79,1$  kg), con experiencia en entrenamiento de resistencia y en competiciones de media maratón.

### 2.3 Diseño experimental

Se realizaron 2 carreras de media maratón distanciadas 14 días para permitir la recuperación del voluntario. Dos horas antes del inicio de las carreras, se suministraron aleatoriamente ZSEC o PLA a cada voluntario. Para evaluar la funcionalidad del ZSEC, se determinaron parámetros analíticos como la percepción subjetiva del esfuerzo realizado (RPE, Rate of Percived Exertion) y la percepción subjetiva al dolor muscular (DOMS). Para evaluar la RPE se utilizó la “Escala de Esfuerzo Percibido de Borg” [12], con valores comprendidos entre 6 y 20; donde 6 indica un ejercicio muy, muy suave y 20 muy, muy intenso. La DOMS se evaluó justo al finalizar la carrera y transcurridas 24, 48 y 72 h, mediante una escala de 5 puntos, donde 1 significa que el participante no siente dolor y 5 cuando el dolor es máximo, con incapacidad física en un entrenamiento inmediato. Además se realizaron extracciones sanguíneas, para determinar el contenido de arginina y lactato, antes de las pruebas deportivas (nivel basal), inmediatamente después de las carreras (post-carrera) y transcurridas 24, 48 y 72 horas.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respecto a la RPE, no se observaron diferencias significativas entre PLA y ZSEC, obteniéndose valores de  $15,4 \pm 1,9$  y  $15,4 \pm 1,8$ , respectivamente. Esto demuestra que las carreras fueron de máximo esfuerzo. Con respecto a la DOMS, no se observaron diferencias en post-carrera. Sin embargo, los voluntarios que ingirieron ZSEC percibieron un menor dolor muscular a las 24, 48 y 72 h post-carrera frente a los que tomaron PLA (datos no mostrados). Estos resultados se correlacionan con los de Bendahan et al. [13] quienes demostraron que la L-cit facilitaba la recuperación de la fatiga muscular después del ejercicio físico.

Los voluntarios que ingirieron ZSEC incrementaron las concentraciones plasmáticas de arginina y en la concentración de lactato, post-carrera (Fig. 1). Estudios previos han observado resultados similares [3]. Estos resultados respaldan los reportados por Schaefer et al. [14] quienes demostraron que un aumento en la concentración de arginina reducía el incremento de lactato inducido por el ejercicio.

## 4. CONCLUSIONES

El zumo enriquecimiento en L-cit incrementó las concentraciones plasmáticas de arginina, disminuyó la percepción de dolor muscular a las 24, 48 y 72 h post-carrera, y las concentraciones de lactato fueron inferiores a las obtenidas con PLA.

## 5. AGRADECIMIENTOS

A la Asociación Grupo Fashion (AGF) la financiación recibida para realizar este estudio.

## 6. REFERENCIAS

- [1] Ozen A.E., Pons A., Tur J.A. 2012. Worldwide consumption of functional foods: a systematic review. *Nutr. Rev.* 70(8): 472-481.
- [2] Curis E., Nicolis I., Moinard C., Osowska S., Zerrouk N., Bénazeth S., Cynober L. 2005. Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids.* 29: 177-205.
- [3] Mandel H., Levy N., Izkovitch S., Korman, S. H. 2005. Elevated plasma citrulline and arginine due to consumption of *Citrullus vulgaris* (watermelon). *J. Inherit. Metab. Dis.* 28: 467-472.
- [4] Tarazona-Díaz M.P., Alacid F., Carrasco M., Martínez I., Aguayo E. 2013. Watermelon juice: a potential functional drink for enhancing anaerobic performance and relieve muscle soreness in athletes. *J. Food Chem.* 61: 7522-7528.

[5] Blasco-Alonso J, Sánchez-Yáñez P, Rosa Camacho V, Camacho Alonso J.M., Yahyaoui Macías R, Gil-Gómez R., Milano Manso G. 2015. La cinética de la citrulina y la arginina y su valor como factor pronóstico en pacientes pediátricos críticamente enfermos. *Anales de Pediatría* 83(4): 257-263.

[6] Osowska S, Moineard C., Loi C., Neveux N., Cynober L. 2004. Citrulline increases arginine pools and restores nitrogen balance after massive intestinal resection. *Gut*. 53: 1781-1786.

[7] Suzuki T, Morita M, Kobayashi Y, Kamimura A. 2016. Oral L-citrulline supplementation enhances cycling time trial performance in healthy trained men: Double-blind randomized placebo-controlled 2-way crossover study. *J. Int. Soc. Sport Nutr.* 13: 1-8.

[8] Bescós R, Sureda A., Tur J.A., Pons A. 2012. The effect of nitric-oxide-related supplements on human performance. *Sports Med.* 42(2): 99-117.

[9] Córdova A, Sureda A., Tauler P., Ferrer M.D., Villa G., Tur J.A., Pons A. 2005. Efectos de la citrulina sobre la producción de óxido nítrico y la eliminación del nitrógeno de las proteínas durante una actividad física intensa. *Arch. Med. Deporte* 22: 497-498.

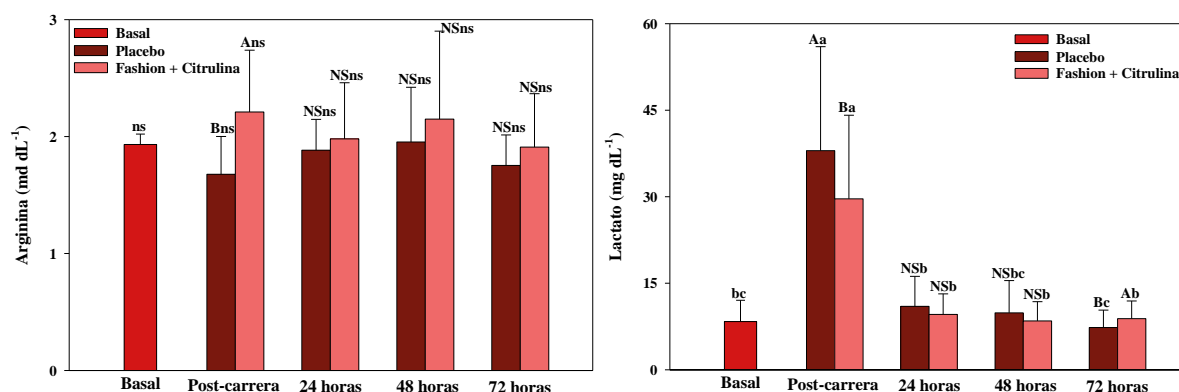
[10] Cutrufello PT, Gadomski SJ, Zavorsky GS. The effect of L-citrulline and watermelon juice supplementation on anaerobic and aerobic exercise performance. 2015. *J. Sports Sci.* 33(14): 1459-1466.

[11] Tarazona-Díaz M.P, Viegas J., Moldao Martins M., Aguayo E. 2011. Bio-active compounds of different cultivars from flesh and by-product of fresh-cut watermelons. *J. Sci. Food Agric.* 91: 805-812.

[12] Borg G. 1998. Borg's Perceived Exertion and Pain scales. Human Kinetics, Champaign, IL, USA. Pp. 104.

[13] Bendahan D., Mattei J. P., Ghattas B., Confort-Gouny S., Le Guern M.E., Cozzone P.J. 2002. Citrulline malate promotes aerobic energy production in human exercising muscle. *Br. J. Sport Med.* 36: 282-289.

[14] Schaefer A, Piquard F., Geny B., Doutreleau S., Lampert E., Mettauer B., Lonsdorfer J. L-arginine reduces exercise-induced increase in plasma lactate and ammonia. 2002. *Int. J. Sports Med.* 23: 403-407.



**Figura 1.** Evolución de la concentración de arginina y lactato plasmático tras la ingesta del placebo (PLA) respecto del zumo enriquecido con citrulina (ZSEC). Letras mayúsculas comparan las bebidas para un mismo tiempo y minúsculas la misma bebida a lo largo del tiempo.

## Modification in the phenylpropanoid metabolism induced by the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans* in chilli pepper CM334

## Modificaciones en el metabolismo fenilpropanoide inducido por el nematodo falso agallador *Nacobbus aberrans* en chile CM334

N. López-Martínez<sup>1,2\*</sup>, J.P. Fernández-Trujillo<sup>2</sup>, M. Biesaga<sup>3</sup>, E. Zavaleta-Mejía<sup>4</sup>

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

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

<sup>3</sup> Department of Chemistry, University of Warsaw, Pasteura 1, 02-093. Warsaw, Poland.

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

\*noessp@yahoo.com

### **Abstract**

Resistance in the genotype of chilli pepper CM334 against the three major species of root-knot nematodes and the oomycete *Phytophthora capsici* has been associated with the phenylpropanoid pathway of secondary metabolism. However, the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans* could induce changes in this pathway. In this work, L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity and the content of total soluble phenols (TSP) were determined in foliage of CM334 plants inoculated with *N. aberrans*, *P. capsici* or both pathogens. Besides, the phenylpropanoid profile was analyzed by HPLC-ESI/MS. The highest values of PAL activity and content of TSP were registered in plants inoculated only with *P. capsici*, while those plants inoculated with *N. aberrans* alone or in combination with *P. capsici* showed the lowest level ( $P < 0.05$ ). Phenolic acids (*p*-HBA, gallic, caffeic, syringic, sinapic, ferulic, vanillic, *p*-coumaric and chlorogenic) and flavonoids (rutin, apigenin and luteolin) were found in foliage. Chlorogenic acid and luteolin were the phenylpropanoid compounds in highest quantity in CM334. Concentration of *p*-hydroxy benzoic and chlorogenic acids and flavonoids was lower in plants inoculated with *N. aberrans* than in the control ( $P < 0.05$ ) at any sampling date. These results confirm that *N. aberrans* induced modifications in phenylpropanoid metabolism.

**Keywords:** Enzymatic activity; flavonoids; phenolic acids; resistance.

### **Resumen**

La resistencia del genotipo de chile CM334 contra las tres especies de nematodos agalladores y al oomiceto *Phytophthora capsici* ha sido asociada con la ruta fenilpropanoide del metabolismo secundario. Sin embargo, el nemátodo falso agallador de raíz *Nacobbus aberrans* podría inducir cambios en esta ruta. La actividad de la enzima L-fenil alanina amonio liasa (PAL) y el contenido de fenoles solubles totales (FST) fueron determinados en plantas de CM334 inoculadas con *N. aberrans*, *P. capsici* o con ambos patógenos. El perfilado de compuestos fenilpropanoide fue analizado mediante HPL-



**ESI/MS. Los valores más altos de la actividad de PAL y contenido de FST fueron registrados en plantas inoculadas únicamente con *P. capsici*, mientras aquellas plantas inoculadas con *N. aberrans* solo o en combinación con *P. capsici* mostraron los niveles más bajos ( $P<0.05$ ). Ácidos fenólicos (*p*-HBA, gálico, caféico, siríngico, sinápico, ferúlico, vanílico, *p*-coumárico y clorogénico) y flavonoides (rutina, apigenina y luteolina) fueron encontrados en el follaje. El ácido clorogénico y la leutolina fueron los compuestos fenilpropanoides en mayor cantidad en CM334. La concentración de los ácidos *p*-HBA, clorogénico y los flavonoides fue más baja en las plantas inoculadas con *N. aberrans* que en el control ( $P<0.05$ ) en cualquier tiempo de muestreo. *N. aberrans* indujo modificaciones en el metabolismo fenilpropanoide.**

**Palabras clave:** Actividad enzimática; flavonoides; ácidos fenólicos; resistencia.

## 1. INTRODUCTION

Resistance to *Phytophthora capsici* root rot in CM334 is determined by different genes to *P. capsici* foliar blight [1, 2]. Therefore, two different mechanisms appear to be conferring resistance to phytophthora root rot and to foliar blight in CM334 chilli pepper plants. However, the infection of CM334 by the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans* delayed the hypersensitive response to foliar inoculation with *Pseudomonas syringae* pv *tagetis* [3]. It indicates that *N. aberrans* could induce modifications in some defence responses in foliage. At moment, defence mechanisms in root of CM334 to *N. aberrans* has been biochemically characterized but little information about their effect in foliage defence system has been published [4]. Considering the importance of phenylpropanoid metabolism in plant defence mechanisms, in this investigation L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity and the content of total soluble phenols (TSP) were measured in the foliage of CM334 plants inoculated with *P. capsici* alone or in combination with *N. aberrans*. Besides, the profiling, characterization and quantity of phenylpropanoid compounds was analyzed.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Chili pepper plants, inoculum preparation and inoculation

The maintaining of plants (CM334), inoculum preparation and inoculation were carried out according a previous report [5]. Inoculation with *P. capsici* was carried out 21 days after inoculation with *N. aberrans*. At 6 h after inoculation with the oomycete, plants were harvested for their analysis of enzymatic activity and TSP. The experiment was repeated once.

### 2.2 Enzymatic activity and analysis of phenylpropanoids compounds

PAL activity and the content TSP were measured in foliage of CM334 plants inoculated with *N. aberrans* alone or in combination with *P. capsici*. These evaluations were measured spectrophotometrically [5]. The profiling, characterization and quantity of phenylpropanoid compounds was evaluated at different sampling points (7, 14, 21 and 28 days after inoculation only with *N. aberrans*) using a HPLC-ESI-MS method [6].

### 2.3 Statistical Analysis

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

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Enzymatic activity and analysis of phenylpropanoids compounds in chilli pepper plants infected by *N. aberrans*

Either PAL activity and the content of TSP were significantly ( $P \leq 0.05$ ) different among treatments (Table 1). Phenolic acids (*p*-HBA, gallic, caffeic, syringic, sinapic, ferulic, vanillic, *p*-coumaric and chlorogenic) and flavonoids (rutin, apigenin and luteolin) were found in the profile of foliage extracts (Tables 2). Chlorogenic acid and luteolin were the phenylpropanoid compounds in highest quantity. In all sampling points, plants inoculated with *N. aberrans* showed lower content of *p*-HBA and chlorogenic acids ( $P < 0.05$ ). On the other hand, nematode constantly induced lower content of flavonoids in foliage than control ( $P < 0.05$ ). Although it has been reported that phytophthora foliar blight resistance genes are independent of root rot resistance genes [1], it is plausible that CM334 genotype possesses some unique physiological attributes that give it a wide range of resistance. Then, it has sense that the infection in roots by *N. aberrans* delayed defense mechanisms in foliar system modifying the phenylpropanoid metabolism.

### 4. CONCLUSIONS

The false root-knot nematode *Nacobbus aberrans* was able to modify at systemic level the defense responses related with phenylpropanoid metabolism in CM334. This modification could be enough for the establishment of foliar pathogens.

### 5. ACKNOWLEDGEMENTS

Our thanks go to Dirección General Académica of Universidad Autónoma Chapingo for the financial support for participate in WiA17. We also appreciate at the Structural Research Laboratory (University of Warsaw, Poland) for using HPLC-ESI-MS.

### 6. REFERENCES

- [1] Walker S.J., Bosland P.W. 1999. Inheritance of phytophthora root rot and foliar blight resistance in pepper. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 124(1):14-18.
- [2] Oelke L.M., Bosland P.W. 2003. Differentiation of race specific resistance to phytophthora root rot and foliar blight in *Capsicum annum*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 128 (2):213-218.
- [3] Villar-Luna E., Rojas-Martínez R.I., Reyes-Trejo B., Gómez-Rodríguez O., Zavaleta-Mejía E. 2009. Respuesta hipersensitiva en el follaje de chile CM-334 resistente a *Phytophthora capsici* infectado con *Nacobbus aberrans*. Nematropica 39:143-155.
- [4] Villar-Luna E., Reyes-Trejo B., Rojas-Martínez R.I., Gómez-Rodríguez O., Hernández Angiano A.M., Zavaleta-Mejía E. 2017. Mevalonate pathway genes expressed in chilli CM334 inoculated with *Phytophthora capsici* and infected by *Nacobbus aberrans* and *Meloidogyne enterolobii*. Eur. J. Plant Pathol. 1-15. doi:10.1007/s10658-016-1142-0
- [5] López-Martínez N., Colinas-León M.T., Peña-Valdivia C.B., Salinas-Moreno Y., Fuentes-Montiel P., Biesaga M., Zavaleta-Mejía E. 2011. Alterations in peroxidase activity and phenylpropanoid metabolism induced by *Nacobbus aberrans* Thorne and Allen, 1944 in chilli (*Capsicum annum* L.) CM334 resistant to *Phytophthora capsici* Leo. Plant Soil 338: 399-409.
- [6] Sergiel I., Pohl P., Biesaga M. 2014. Characterization of honeys according to their content of phenolic compounds using high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Food Chem. 145: 404-408.

**Table 1.** PAL Activity (nM *trans*-cinnamic acid  $\mu\text{g}^{-1}$  protein  $\text{min}^{-1}$ ) and content of total soluble phenol (TSP) in foliage of chilli pepper plants (*Capsicum annuum*) CM334 inoculated with *N. aberrans*, *P. capsici*, or both pathogens at 6 hours after inoculation with *P. capsici*. The inoculation with the oomycete was carried out 21 days after nematode inoculation.

Treatment	PAL Activity (nM <i>trans</i> -cinnamic acid $\mu\text{g}^{-1}$ protein $\text{min}^{-1}$ )	TSP (mg tannic acid $\text{g}^{-1}$ dry matter)
Control	20.1 <sup>b</sup>	5.3 <sup>b</sup>
<i>P. capsici</i>	28.2 <sup>a</sup>	7.8 <sup>a</sup>
<i>N. aberrans</i>	11.7 <sup>c</sup>	4.1 <sup>c</sup>
<i>N. aberrans</i> - <i>P. capsici</i>	12.9 <sup>c</sup>	3.8 <sup>c</sup>

Values are the means of six replicates from two independent experiments. Values following by the same letter are not significantly different according to Tukey's protected least significant difference at  $P \leq 0.05$ .

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

Compound	Time after inoculation (days)							
	7		14		21		28	
	Inoculated	Control	Inoculated	Control	Inoculated	Control	Inoculated	Control
<i>Phenolic acids</i>								
<i>p</i> -HBA	0.61 <sup>b</sup>	1.2 <sup>a</sup>	2.6 <sup>b</sup>	5.1 <sup>a</sup>	2.1 <sup>b</sup>	2.4 <sup>a</sup>	2.0 <sup>b</sup>	2.2 <sup>a</sup>
Gallic	1.1 <sup>b</sup>	1.4 <sup>a</sup>	1.1 <sup>a</sup>	1.2 <sup>a</sup>	1.05 <sup>a</sup>	1.08 <sup>a</sup>	1.06 <sup>a</sup>	1.03 <sup>a</sup>
Caffeic	2.9 <sup>b</sup>	4.0 <sup>a</sup>	8.3 <sup>a</sup>	8.1 <sup>a</sup>	8.5 <sup>a</sup>	8.12 <sup>a</sup>	10.4	13.8 <sup>a</sup>
Syringic	0.7 <sup>b</sup>	0.9 <sup>a</sup>	0.9 <sup>a</sup>	0.94 <sup>a</sup>	1.03 <sup>a</sup>	1.04 <sup>a</sup>	1.16 <sup>a</sup>	1.2 <sup>a</sup>
Synapic	0.9 <sup>b</sup>	1.2 <sup>a</sup>	2.6 <sup>b</sup>	4.7 <sup>a</sup>	3.7 <sup>a</sup>	3.5 <sup>a</sup>	4.1 <sup>a</sup>	4.3 <sup>a</sup>
Ferulic	0.7 <sup>b</sup>	0.9 <sup>a</sup>	1.0 <sup>a</sup>	1.1 <sup>a</sup>	1.5 <sup>a</sup>	1.6 <sup>a</sup>	1.4 <sup>b</sup>	1.8 <sup>a</sup>
Vanillic	0.7 <sup>b</sup>	1.1 <sup>a</sup>	1.6 <sup>b</sup>	2.2 <sup>a</sup>	2.0 <sup>a</sup>	2.1 <sup>a</sup>	1.8 <sup>a</sup>	1.7 <sup>a</sup>
<i>p</i> -Coumaric	-	-	2.0 <sup>b</sup>	3.1 <sup>a</sup>	2.6 <sup>a</sup>	2.6 <sup>a</sup>	2.6 <sup>b</sup>	3.4 <sup>a</sup>
Chlorogenic	380 <sup>b</sup>	458 <sup>a</sup>	279 <sup>b</sup>	446 <sup>a</sup>	277 <sup>b</sup>	338 <sup>a</sup>	304 <sup>b</sup>	328
<i>Flavonoids</i>								
Apigenin	1.4 <sup>b</sup>	13.3 <sup>a</sup>	16.3 <sup>b</sup>	29.8 <sup>a</sup>	9.7 <sup>b</sup>	20.5 <sup>a</sup>	13.1 <sup>b</sup>	16.8 <sup>a</sup>
Luteolin	0.5 <sup>b</sup>	5.3 <sup>a</sup>	15.5 <sup>b</sup>	43.2 <sup>a</sup>	22.0 <sup>b</sup>	43.9 <sup>a</sup>	16.9 <sup>b</sup>	20.8 <sup>a</sup>
Rutin	2.7 <sup>b</sup>	3.1 <sup>a</sup>	1.7 <sup>b</sup>	2.7 <sup>a</sup>	1.7 <sup>b</sup>	2.1 <sup>a</sup>	1.5 <sup>a</sup>	1.6 <sup>a</sup>

Values are the means of 6 replicate from two independents experiments. In each time sampling point, for each phenolic acid, inoculated and non-inoculated plants were compared. Values following by the same letter are not significantly different according to Tukey's protected least significant difference at  $P \leq 0.05$ . - No detected.

## Effect of microwave thermal treatment and stress conditions (acid shock) on *Listeria monocytogenes* in food

## Efecto de tratamiento térmico por microondas y condiciones de estrés (choque ácido) sobre *Listeria monocytogenes* en alimentos

J.A. Sotomayor-Ballesta<sup>1\*</sup>, A. Iguaz-Gaínza<sup>1</sup>, P.M. Periago-Bayonas<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Campus de Excelencia Internacional Regional, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, Cartagena, Murcia, Spain.

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología Vegetal, Campus de Excelencia Internacional Regional "Campus Mare Nostrum". Universidad Politécnica de Cartagena, Spain.

\*jasb1@alu.upct.es

### **Abstract**

Microorganisms have the ability to develop adaptive responses when they are subjected to sublethal conditions, triggering general defense mechanisms which are capable to increase resistance to this and other stresses, among those it's can be found the different methods of food preservation. Among the methods of bacterial inactivation at the industrial level, conventional thermal treatments present many advantages and is one of the most widely used. However, microwave processing, although has also several advantages is not so high employed. Therefore, the present project aims at determining the effect of different stressing conditions like acid shock as well as the effect of the heating medium pH on the inactivation of *Listeria monocytogenes* treated with technologies such as conventional thermal and microwaves treatments, among others, in food. The results obtained have shown that the acid shock affects the microorganism thermoresistance by decreasing its resistance by microwave heating.

**Keywords:** Microbial inactivation; heat resistance; microwave; acid shock.

### **Resumen**

Los microorganismos poseen capacidad de desarrollar respuestas de carácter adaptativo cuando han sido sometidos a condiciones subletales, activando mecanismos generales de defensa capaces de provocar un aumento en su resistencia a éste y otros estreses, entre los que se encuentran los diferentes métodos de conservación de alimentos. Entre los métodos de inactivación bacteriana a nivel industrial, el tratamiento térmico convencional presenta numerosas ventajas y es uno de los más extensamente utilizados. Sin embargo, el procesado con microondas tiene también ventajas y no es tan empleado. Por lo tanto, el presente proyecto tiene como objetivos la determinación del efecto de diferentes condiciones de estrés, como un choque ácido, así como el efecto del pH del medio de calentamiento sobre la inactivación de *Listeria monocytogenes* sometida a tecnologías como un tratamiento térmico convencional y tratamiento por microondas, entre otros, en alimento. Los resultados mostraron que un choque ácido afecta a la termorresistencia del microorganismo, disminuyendo su resistencia a un calentamiento por microondas.

**Palabras clave:** Inactivación microbiana; resistencia al calor; microondas; choque ácido.

## 1. INTRODUCCIÓN

Durante muchos años de investigación microbiológica, numerosos son los estudios que demuestran que cuando determinados microorganismos son expuestos, durante un tiempo predeterminado, a una situación adversa (estresante), son capaces de sobrevivir, posteriormente, a una situación letal. Este fenómeno es conocido como adaptación al estrés. Además, se ha observado que la inducción de la tolerancia a un determinado tipo de estrés, conlleva la tolerancia a otros tipos de estrés, aunque éstos sean letales en ausencia de una inducción previa (resistencia cruzada) [1, 2]. *Listeria monocytogenes* es capaz de expresar proteínas del choque térmico cuando desarrolla resistencias subletales al calor, aunque este mecanismo continúa sin esclarecerse totalmente para este microorganismo [3]. Son muchos los factores que influyen en la resistencia al calor de *Listeria monocytogenes*, como serían el tipo de cepa, las condiciones de crecimiento previas, exposiciones previas a otros estreses, tipo de alimento en el que se encuentre, el diseño experimental llevado a cabo, entre otros.

El principal objetivo de cualquier proceso de conservación es minimizar el crecimiento de microorganismos alterantes y patógenos. Por lo tanto, las investigaciones de hoy en día están encaminadas hacia la búsqueda de técnicas que cada vez garanticen más la calidad y seguridad alimentaria con la mínima alteración de las cualidades nutritivas y organolépticas del producto.

En los últimos años, el uso del calentamiento por microondas para mejorar la seguridad microbiológica se ha utilizado en el procesado de alimentos durante varias décadas, como en el secado, la descongelación y la esterilización, entre otros [4]. El calentamiento por microondas tiene lugar como resultado de la fricción molecular entre las moléculas de agua presentes en el alimento, bajo un campo eléctrico oscilante a una frecuencia específica [5]. Por lo tanto, el presente proyecto tiene como objetivos la determinación del efecto de diferentes condiciones de estrés, como un choque ácido, así como el efecto del pH del medio de calentamiento sobre la inactivación de *Listeria monocytogenes* sometida a tecnologías como un tratamiento térmico convencional y tratamiento por microondas, entre otros, en alimento.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Microorganismo

Los microorganismos que fueron usados en este estudio son patógenos alimentarios como *Listeria monocytogenes*, entre otros, proporcionados por Colecciones de Cultivo como la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España).

### 2.2 Aplicación de un choque ácido y otras condiciones de estrés

Se aplicaron choques ácidos siguiendo la metodología especificada por Sotomayor Ballesta [6] y otros tipos de estreses. En este caso, cultivos frescos de *L. monocytogenes* fueron centrifugados dos veces a 4000 rpm durante diez minutos y re-suspendidos en TSB (Scharlau Chemie SA, Barcelona, España) a pH  $7,1 \pm 0,3$ . Por último, se realizó otra centrifugación en las mismas condiciones y, en este caso, el pellet fue re-suspendido en TSB a pH  $4,5 \pm 0,2$  con ácido cítrico 1N (Panreac, Barcelona, España) y se incubó a 37°C durante treinta minutos. Se comprobó que el valor de pH de los diferentes medios no variaba tras el tratamiento de esterilización.

### 2.3. Determinación de la termorresistencia/inactivación de *L. monocytogenes* mediante tratamiento por microondas.

Se utilizó un equipo de microondas (imagen 1) provisto de sensores de fibra óptica que registran la temperatura en diferentes puntos de la muestra. Para los análisis, se utilizaron dos medios de calentamiento diferentes: leche de soja y crema de verduras. Los experimentos se realizaron calentando rápidamente la muestra (población inicial de  $10^6$  UFC/mL) desde una

temperatura de 25 °C hasta alcanzar la temperatura de tratamiento (50, 60 70 y 80 °C), cuando fueron retirados del equipo y enfriados. Cada condición experimental se realizó por triplicado.



**Imagen 1:** Equipo de microondas diseñado por el grupo GEM del Laboratorio de Electromagnetismo y Materia (Edificio ELDI - UPCT).

### 3. RESULTADOS

En la Figura 1 se observa que, a temperaturas de tratamiento bajas (50 y 60 °C), un medio de calentamiento ácido no favorece la termorresistencia del microorganismo frente a un medio de calentamiento neutro, mientras que a temperaturas altas (70 y 80 °C), un medio de calentamiento neutro es más eficaz en la inactivación del microorganismo que un medio de calentamiento ácido.

En la Figura 2 se puede apreciar que, a mayor temperatura de tratamiento, mayor es la reducción de la carga microbiana. Al comparar ambas figuras, se observa que un choque ácido previo disminuye la termorresistencia del microorganismo a temperaturas altas (70 y 80 °C), mientras que a temperaturas bajas (50 y 60 °C) no consigue una mayor inactivación.

### 4. CONCLUSIONES

- La termorresistencia de *Listeria monocytogenes* 4032 es afectada, tanto por un choque ácido previo, como por el pH del medio de calentamiento.
- Un choque ácido a pH 4,5 disminuye la termorresistencia de *Listeria monocytogenes* 4032.
- A temperaturas de tratamiento bajas (50 y 60 °C) y sin choque ácido previo, un medio de calentamiento ácido no favorece la termorresistencia de *Listeria monocytogenes* 4032.
- A temperaturas de tratamiento altas (70 y 80 °C) y sin choque ácido previo, un medio de calentamiento neutro favorece la inactivación de *Listeria monocytogenes* 4032.

### 5. AGRADECIMIENTOS

Ministerio de Economía y Competitividad, proyecto AGL-2013- 48993-C2-1-R.

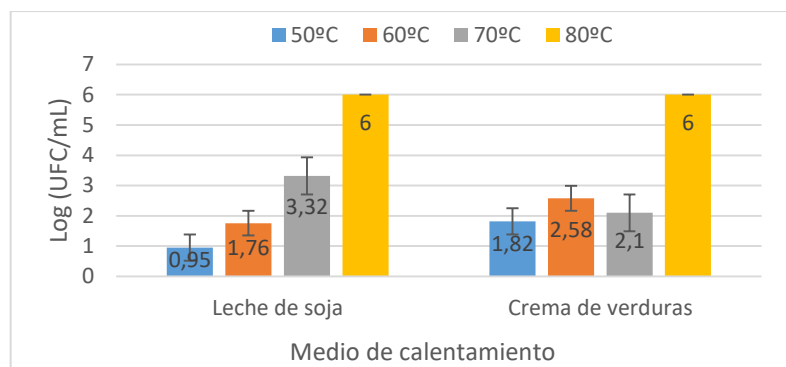
### 6. REFERENCIAS

- [1] Hill C., Cotter P.D., Sleator R.D., Gahan C.G.M. 2002. Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. *Int. Dairy J.* 12: 273–283.
- [2] Van Schaik W., Van der Voort M., Molenaar D., Moezelaar R., De Vos W.M., Abee T. 2007. Identification of the  $\sigma$ B Regulon of *Bacillus cereus* and Conservation of  $\sigma$ B – Regulated Genes in Low-GC-Content Gram-Positive Bacteria. *J. Bacteriol.* 12: 4384–4390.
- [3] Sergelidis D., Abraham A. 2009. Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to heat and its impact on food safety. *Food Control* 20: 1-10.

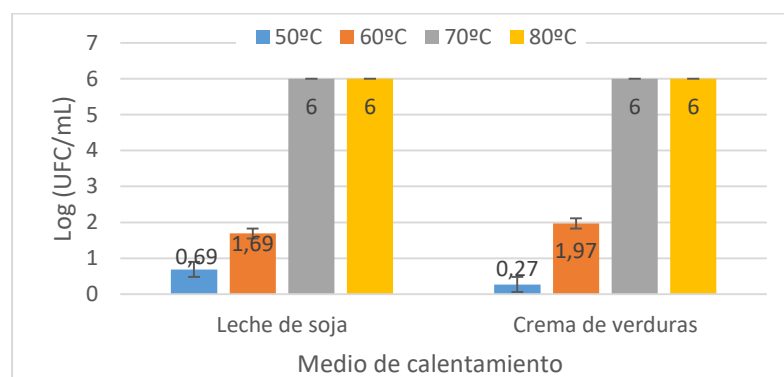
[4] Huang Y., Nandini K.E., Lakshmi M.C., Subramanian R. 2007. Effect of enzyme inactivation by microwave and oven heating on preservation quality of green tea. J. Food Eng. 78: 687–692.

[5] Pucciarelli A.B., Benassi F.O. 2005. Inactivation of Salmonella enteritidis on raw poultry using microwave heating. Braz. Arch. Biol. Techn. 48: 939 – 945.

[6] Sotomayor Ballesta, J.A. (2015). Efecto de un choque ácido y del pH del medio de calentamiento sobre la termorresistencia de *L. monocytogenes*. Proyecto fin de Máster. Universidad Politécnica de Cartagena, Departamento de Ingeniería de los Alimentos y del Equipamiento Agrícola. Cartagena, España.



**Figura 1.** Reducción logarítmica de *Listeria monocytogenes* 4032 tras un tratamiento térmico por microondas sin choque ácido previo en leche de soja y crema de verduras.



**Figura 2.** Reducción logarítmica de *Listeria monocytogenes* 4032 tras un tratamiento térmico por microondas con choque ácido previo en leche de soja y crema de verduras.

## Effect of substrate on parameters of thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*

### Efecto del sustrato sobre parámetros de inactivación térmica de *Listeria monocytogenes*

G.A. González-Tejedor<sup>1\*</sup>, F. Artés-Hernández<sup>1,2</sup>, P.S. Fernández<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ingeniería de Alimentos. Universidad de Politécnica de Cartagena - UPCT. 30203. Cartagena, Spain.

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

\* gerardo.gonzalez@utp.ac.pa

#### **Abstract**

**The inactivation of *Listeria monocytogenes* in skimmed milk and TSB medium (Tryptic Soy Broth) with close to neutral pH and isothermal treatment at 55 and 57.5°C has been evaluated. Milk was thermally treated during 3 min at 95°C and subsequently inoculated. The substrate (milk and TSB), do not exert an important effect on the parameters of thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*.**

**Keyword:** milk; minimal processing; heat treatment; food safety.

#### **Resumen**

**Se ha evaluado la inactivación de *Listeria monocytogenes* en leche desnatada y medio TSB (Tryptic Soy Broth) con pH cercano al neutro y tratamientos isotérmicos a 55 y 57.5°C. La leche se trató térmicamente a 95°C durante 3 min y posteriormente fue inoculada. El sustrato (leche y TSB), no ejercen un efecto importante sobre los parámetros de inactivación térmica de *Listeria monocytogenes*.**

**Palabras clave:** leche; procesado mínimo; tratamiento térmico; seguridad alimentaria.

## **1. INTRODUCCIÓN**

*L. monocytogenes* es un patógeno Gram-positivo transmitido por los alimentos, que es capaz de sobrevivir en un amplio rango de ambientes, tales como temperaturas de refrigeración, pH bajo y altos niveles de NaCl. Se ha demostrado que puede sobrevivir a tratamientos térmicos suaves [1]. También se ha demostrado que la resistencia al calor de diferentes microorganismos se incrementa cuando sus células son expuestas durante un período corto de tiempo a temperaturas moderadamente elevadas, normalmente por encima del máximo para su crecimiento, antes de aplicar el tratamiento térmico para su inactivación [2]. Esto permite utilizar determinadas temperaturas para realizar estudios sobre inactivación térmica.

Diferentes factores antes y durante la manipulación de los alimentos pueden causar contaminación microbiana de productos frescos [3]. La disponibilidad de nutrientes y la alta actividad de agua de algunos productos, promueven el rápido crecimiento de patógenos alimentarios [4]. La posible presencia de especies patógenas en las materias primas (leche), entre ellas *L. monocytogenes*, representa un riesgo microbiológico incluso a temperaturas de refrigeración [5]. Por lo tanto, para garantizar su seguridad, la leche requiere un proceso de pasteurización adecuado para posibilitar la destrucción de patógenos y reducir la flora



microbiana de deterioro. Sin embargo, el proceso térmico puede ser acortado a 15–30 s. mediante una pasteurización rápida a elevada temperatura, por lo que el estudio del binomio tiempo temperatura es fundamental [6]. También es necesario evitar la recontaminación posterior del producto con microorganismos patógenos.

La presencia demostrada de *L. monocytogenes* bajo condiciones de refrigeración [7], puede representar un peligro potencial para la salud dada la conocida capacidad de *L. monocytogenes* para sobrevivir en productos almacenados durante largos periodos en refrigeración.

En alimentos listos para el consumo que puedan permitir el desarrollo de *L. monocytogenes* antes de que el alimento haya dejado el control inmediato de la empresa alimentaria que los haya producido, debe demostrar que el producto no superará el límite de 100 UFC/g durante su vida útil; Si no se puede demostrar, se considera satisfactorio si todos los valores observados indican ausencia de la bacteria e insatisfactorio si se detecta la presencia de la bacteria en cualquiera de las muestras [8].

El objetivo de este estudio fue evaluar efecto del sustrato sobre parámetros de inactivación térmica de *Listeria monocytogenes*.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Preparación de la Cepa utilizada

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

### 2.2 Inoculación de los sustratos

Los sustratos leche desnatada (previamente tratada térmicamente a 95°C) y TSB se inocularon con *L. monocytogenes* (CECT 4032) en concentraciones iniciales de  $10^6$  a temperaturas constantes de 55 y 57.5°C. Se estudió la inactivación de *L. monocytogenes* (CECT 4032) a las temperaturas indicadas.

### 2.3 Recuento microbiológico de *L. monocytogenes*

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

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las Figuras 1 y 2, se pueden observar las curvas de inactivación de *L. monocytogenes* tras un tratamiento isotérmico en leche desnatada y un medio de calentamiento con pH neutro. A 55°C y 57.5°C, las curvas de inactivación presentan un comportamiento lineal, con una ligera cola a 57.5°C para la leche. La presencia de colas en curvas de inactivación se puede asumir como una situación en la que el microorganismo se ha adaptado a las condiciones estresantes y su población no disminuye, es decir, se mantiene constante. Por lo tanto, resulta ser una circunstancia desagradable en el ámbito de la industria agroalimentaria. En el estudio dirigido por Murphy, Beard, Martin, Duncan, y Marcy [9], *L. monocytogenes* tuvo mayor resistencia que *Salmonella spp.* y *E. coli* O157:H7 cuando se trataron térmicamente a 55°C. Sharma, Adler, Harrison y Beuchat [10] también reportaron que *L. monocytogenes* fue relativamente más termoresistente que *E. coli* O157:H7 y *Salmonella spp.* cuando se trataron a 57°C en zumo de melón.

Ambos sustratos (leche y TSB) tratado a 55°C presentaron una reducción de 5 ciclos logarítmicos después de 60 minutos sin diferencias importantes a lo largo del estudio observándose una menor desviación de la cinética de primer orden en el medio TSB que en leche (Figura 1). Dichos sustratos a 57.5°C presentaron una reducción de 4 ciclos logarítmicos después de 15 minutos sin diferencias importantes a lo largo de la experiencia, observándose de nuevo menor desviación de la cinética de primer orden en el medio TSB que en leche (Figura 2). La inactivación de *L. monocytogenes* en diferentes sustratos de frutas han sido evaluados por varios autores. Por ejemplo, Hassani et al. [11], reportaron una inactivación de 5 ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes* en un medio de referencia (pH = 4) cuando este fue tratado a 58°C durante 84 s; este resultado difiere con el nuestro a 57.5°C, lo cual demuestra la gran importancia e influencia que tiene el pH sobre el comportamiento de un microorganismos en este caso *L. monocytogenes* ya que el pH utilizado en nuestra experiencia fue cercano a 7.

#### 4. CONCLUSIONES

El sustrato, en este caso leche, no ejerce un efecto importante sobre los parámetros de inactivación térmica de *L. monocytogenes* a 55°C y 57.5°C. La cinética de inactivación observada presentó una mayor desviación de la linealidad en leche que en TSB.

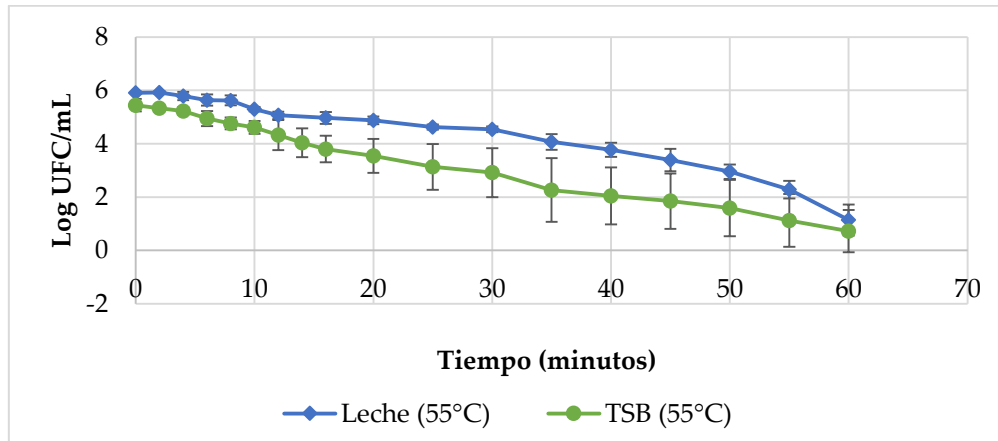
#### 5. AGRADECIMIENTOS

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

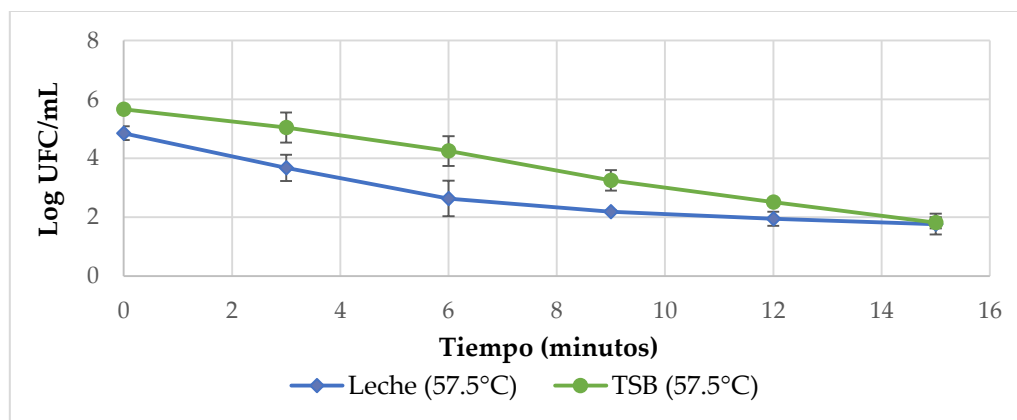
#### 6. REFERENCIAS

- [1] Muñoz, M., Guevara, L., Palop, A., Fernández, P.S., 2010. Prediction of time to growth of *Listeria monocytogenes* using Monte Carlo simulation or regression analysis, influenced by sublethal heat and recovery conditions. *Food Microbiol.* 27(4): 468-475.
- [2] Pagán, R., Condón, S., Sala, F.J. 1997. Effect of several factors on heat-shock-induced thermotolerance of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 63: 3225-3232.
- [3] De Roever, C. 1998. Microbial safety evaluation and recommendation on fresh produce. *Food Control.* 9: 321-347
- [4] Tournas, V. H., Heeres, J., Burgess, L. 2006. Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food Microbiol.* 23: 684-688.
- [5] Scolari, G., Zacconi, C., Busconi, M., Lambri, M. 2015. Effect of the combined treatments of high hydrostatic pressure and temperature on *Zygosaccharomyces bailii* and *Listeria monocytogenes* in smoothies. *Food Control.* 47: 166-174.
- [6] Castillejo, N., Martínez-Hernández, G.B., Gómez, P.A., Artés F., Artés-Hernández, F. 2016. Red fresh vegetables smoothies with extended shelf life as an innovative source of health-promoting compounds. *J Food Sci Technol.* 53(3): 1475-1486.
- [7] Cobo-Molinos, A., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Valdivia, E., Gálvez, A. 2008. Inactivation of *Listeria monocytogenes* in raw fruits by enterocin AS-48. *J Food Protect.* 71(12): 2460-2467.
- [8] Regulation (EC) 1441/2007. 2007. Commission regulation on microbiological criteria for foodstuffs. *OJ L* 322, 7.12.2007. 32: 12-29.
- [9] Murphy, R. Y., Beard, B. L., Martin, E. M., Duncan, L. K., Marcy, J. L. 2004. Comparative study of thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in ground pork. *J Food Sci.* 69(4): 97-101.
- [10] Sharma, M., Adler, B. B., Harrison, M. D., Beuchat, L. R. 2005. Thermal tolerance of acid-adapted and unadapted *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in cantaloupe juice and watermelon juice. *Lett Appl Microbiol.* 41: 448-453.

[11] Hassani, M., Mañas, P., Pagán, R., Condón, S. 2007. Effect of a previous heat shock on the thermal resistance of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* at different pHs. *Int J Food Microbiol.* 116: 228-238.



**Figura 1.** Inactivación de *Listeria monocytogenes* inoculada en leche y medio TSB tratados isotérmicamente a 55°C.



**Figura 2.** Inactivación de *Listeria monocytogenes* inoculada en leche y medio TSB tratados isotérmicamente a 57.5°C.



# ORAL SESSION II:

## Agroforestry and Economy Engineering

## Agronomical aspects of desalinated seawater for crop irrigation in the Segura River Basin (south-eastern Spain)

## Aspectos agronómicos del uso del agua desalada para el riego de cultivos en la Cuenca del Segura

M.J. González-Ortega<sup>1\*</sup>, V. Martínez-Álvarez<sup>1</sup>, M. Soto-García<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena, España.

\* mjgo0@alu.upct.es

### **Abstract**

**Agronomical aspects of the use of desalinated seawater (DSW) for crop irrigation in the Segura River Basin (SRB) (SE Spain) were evaluated. This analysis is included within a higher framework study in which several items are taken into, such as planning, environmental (water-energy nexus), carbon footprint and economical aspects. The objective of this higher framework study is to describe and examine from a critical perspective the development and performance of agricultural DSW supply in the SRB. In that regard, different parameters have been analysed for the chemical characterization of DSW, such as salinity, nutrients, phytotoxic elements, RAS, chemical stability and pH. The chemical composition of DSW supplied by four major plants, Águilas, Valdelentisco, Torrevieja and Escombreras is assessed by comparison with Tagus Segura water (TSW) transfer and brackish groundwater (BGW). DSW chemical characterization lays the foundation for blending strategies that should be modelled taking account differences between irrigation districts and irrigated crops in the SRB.**

**Keywords:** Irrigation water; chemical characterization; Tagus-Segura transfer; brackish water.

### **Resumen**

**Este estudio evalúa los aspectos agronómicos que deben ser considerados en el uso del agua marina desalada (DSW) en la cuenca del río Segura (SRB), dentro de un estudio de marco de orden superior, donde se analizan aspectos de planificación, ambientales (agua y energía), huella de carbono y económicos, y donde se describe y examina desde una perspectiva crítica el desarrollo y ejecución del abastecimiento del agua desalada para la agricultura en la cuenca del Segura. En este sentido, para la caracterización de la química del agua desalada, se han analizado datos de salinidad, nutrientes, elementos fitotóxicos, SAR y estabilidad química y pH de las cuatro principales desaladoras (IDAM) que abastecen a las zonas regables (Águilas, Valdelentisco, Torrevieja y Escombreras), realizando una comparación con el Trasvase Tajo Segura (TSW) y el agua de salobre de pozos (BGW). Este estudio sienta las bases de la caracterización química para las estrategias de mezcla que deben ser modelizadas según las diferentes zonas regables y tipología de cultivo de la cuenca.**

**Palabras clave:** Agua de riego; caracterización química; trasvase Tajo-Segura; aguas salobres.

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, en un escenario de creciente sequía, la demanda de agua en cantidad y calidad suficientes para satisfacer a la agricultura de alto valor añadida, como es la agricultura en la cuenca de Segura, toma una importancia transcendental desde el punto de vista económico y social en la zona del sureste de España. La cuenca del Segura (SRB) se caracteriza por presentar un déficit hídrico estructural que afecta al regadío. La última estimación de fuentes viables de agua en la SRB estaba en una media de 1.602 hm<sup>3</sup>/año frente a los 1.834 hm<sup>3</sup>/año de demanda, de los cuales 1.546 hm<sup>3</sup>/año corresponden al agua para uso agrícola [1]. La situación de sequía de estos últimos años ha agravado la distribución de agua *inter* cuencas, reduciéndose el aporte de la que era hasta 2016 la principal fuente de agua la región, como es el agua del Trasvase Tajo Segura [2]. Por este motivo, la importancia del agua desalada como fuente complementaria para el regadío, ha ido ganando peso a lo largo de la última década.

Ya en el 2004, el Programa Agua apareció como alternativa a los aportes de aguas externas en cuencas deficitarias. Este programa representó una apuesta a nivel nacional por el agua marina desalada para el riego agrícola. Gracias a este programa la cuenca del Segura cuenta con 4 grandes plantas desalinizadoras de agua marina, Valdelentisco, Águilas, Torre vieja y Escombreras [3,4].

La calidad agronómica de la DSW es un factor que debe ser tratado de manera específica cuando se va a usar este tipo de agua para el riego agrícola. El agua desalada tiene una composición química bastante diferente al agua usada de manera habitual en la cuenca del Segura para el regadío. El agua desalada tiene un contenido de sales sensiblemente menor al agua del Trasvase Tajo Segura (TSW). Sin embargo de esa concentración de iones, los llamados nutrientes esenciales, se encuentran en una concentración menor, que éstos mismos en el TSW. Además las concentraciones de los llamados compuestos fitotóxicos, en el DSW tiene una cantidad mayor que en el agua de TSW, lo que hace necesario analizar de manera detallada las estrategias de mezcla para que se mitiguen posibles afecciones a los cultivos.

Por lo tanto el objetivo de este estudio es describir y examinar desde una perspectiva crítica y con un enfoque agronómico el desarrollo y actual uso del agua de mar desalada para uso en el regadío de la cuenca del Segura.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio se ha utilizado información primaria, obtenida por los autores mediante entrevistas a las instituciones responsables de la gestión de las plantas desaladoras de agua de mar, así como entrevistas y encuestas a CCRR y gestores de zonas regables.

En el apartado de calidad agronómica de las aguas se han recopilado los siguientes datos correspondientes a pH, Conductividad eléctrica, Alcalinidad como mg L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>, Índice de precipitación de calcio como mg L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub> o índice de Langelier, SAR, Concentración de Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Boro. Los datos obtenidos han sido para las cuatro desaladoras más importantes. Estos valores han sido comparados con agua del trasvase Tajo-Segura, y de 11 pozos de aguas salobre localizado en el campo de Cartagena. Debido a la confidencialidad de los datos y al estar en estado de revisión por parte de los organismos que han cedido los datos, se ha utilizado nomenclatura alfabética para diferenciar las instalaciones.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.1 Salinidad

Como puede observarse en la Tabla 1, la salinidad medida como conductividad eléctrica (CE), toma valores para DSW entre 0,46 a 0,54 dSm<sup>-1</sup> que están por debajo de valores umbrales de los principales cultivos en la zona que van de 0,9 a 1,9 dSm<sup>-1</sup>.

### 2.2 Concentración de Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>

Como puede observarse en la Tabla 1, la concentración media de estos iones está en el entorno de 1/3 de la concentración en las aguas de TS y BSW. Estos elementos son necesarios para el desarrollo de los cultivos y puede extraerse de la fracción mineral del suelo. Sin embargo, en cultivos sin suelos, donde si es necesario aportar cantidades extras de estos tres elementos, las concentraciones están Ca<sup>2+</sup> (80-120 mg L<sup>-1</sup>), Mg<sup>2+</sup> (24-36 mg L<sup>-1</sup>) y SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (100-150 mg L<sup>-1</sup>), muy por encima de lo aportable por cualquiera de DSW.

### 2.3 Concentración de Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup> y B<sup>3+</sup>

Como puede observarse en la Tabla 1, la concentración de Na<sup>+</sup> para DSW está entre 76-115 mg L<sup>-1</sup>, valores aceptables para no causar daños directos en los cultivos, pero que a medio largo plazo puede provocar daños físicos en los suelos de la SRB. Con respecto al Cl<sup>-</sup>, los valores están 140 y 182 mg L<sup>-1</sup>, lo que no presentaría problemas de clorosis [5], aunque como ocurre con el Na<sup>+</sup> la mezcla con aguas salobres pueden provocar que aparezca estos umbrales de clorosis. El B<sup>3+</sup> es un micronutriente, cuya pequeña variación lo convierte en fitotóxico, como puede verse en la Tabla 1, para DSW los valores están 0,56-0,9 mg L<sup>-1</sup>, estando por encima de 0,3 mg L<sup>-1</sup> propuesto como valor máximo para el agua de riego [6].

### 2.4 Riesgo de sodicidad del suelo.

Los valores de RAS para la DSW, debido a la baja concentración de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> que presentan, los valores están en rango de 4 a 5,6 (mmolL<sup>-1</sup>)<sup>0.5</sup>, lo que indica un valor moderado de sodicidad del suelo al medio largo plazo, como se observa en la Figura 1.

### 2.5 Estabilidad química del agua.

El control del potencial de precipitación del CaCO<sub>3</sub> es un elemento de control muy importante en los sistemas de riego en SRB. TSW tiene una alta dureza, LI>1 lo que provoca problemas de obturación en tuberías. Como se observa en la Tabla 1, la dureza de la DSW está próxima a cero, por lo que garantiza que no precipiten estos carbonatos.

## **4. CONCLUSIONES**

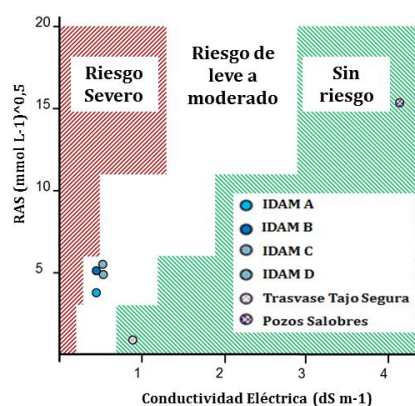
Desde un enfoque agronómico, el uso de DSW en regadío debe contemplarse como un todo, con sus puntos fuertes y débiles. El DSW representa un abastecimiento garantizado de agua y podría sustituir a fuentes tradicionales de agua TSW, sumado a su baja salinidad para posible mezcla, hacen al DSW un pilar fundamental sobre la que sentar las nuevas políticas de aguas. Pero no es posible olvidarse de los problemas de fitotoxicidad o sodicidad del suelo, por lo que se hace necesario el estudio en detalle a nivel de parcela de las características del agua para la modelización de las mezclas.

## **5. AGRADECIMIENTOS**

Esta investigación ha sido financiada por el *Programa de Apoyo a la Investigación de la Fundación Séneca-Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia* a través del proyecto 19280/PI/14. Agradecimientos también a la Cátedra Tránsito y sostenibilidad – José Manuel Claver Valderas, y a los datos suministrados por ACUAMED.

## 6. REFERENCIAS

- [1] Confederación Hidrográfica del Segura. 2015. Plan Hidrológico de la Cuenca del Segura 2015-2021, Murcia.
- [2] Fleskens L., Nainggolan D., Termansen M., Hubacek K., Reed M.S. 2013. Regional consequences of the way land users respond to future water availability in Murcia, Spain. *Reg. Environ. Change* 13: 615–632.
- [3] March H., Saurí D., Rico-Amorós A.M. 2014. The end of scarcity? Water desalination as the new cornucopia for Mediterranean Spain. *J. Hydrol.* 519: 2642-2651.
- [4] Swyngedouw E., Williams J. 2016. From Spain's hydro-deadlock to the desalination Fix. *Water Int.* 41: 54-73.
- [5] Ayers R.S., Westcot D.W. 1985. Water quality for agriculture. FAO Irrigation and Drainage Paper 29, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- [6] Birnhack L., Fridman N., Lahav O. (2009). Potential applications of quarry dolomite for posttreatment of desalinated water. *Desalin. Water Treat.* 1: 58–67.



**Figura 1.** SAR de suelo a medio largo plazo. Puntos DSW IDAM, Tajos Segura y Pozos salobre.

**Tabla 1.** Composición química del agua de las cuatro IDAM, Traslase Tajo Segura (CRR Campo de Cartagena) y Pozos de agua salobre

Parámetro	IDAM A	IDAM B	IDAM C	IDAM D	Traslase Tajo Segura	Pozos agua salobre
CE (dS m <sup>-1</sup> )	0,46	0,48	0,54	0,54 ± 0,15	0,85 ± 0,05	4,51
Ca <sup>2+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	29,00	14,9 ± 2,4	20,00	15,6 ± 1,8	94,6 ± 4,0	229,5 ± 39,3
Mg <sup>2+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	4,30	1,4 ± 0,5	2,40	2,1 ± 1,1	41,7 ± 1,1	99 ± 17
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	6,60	-	4,00	-	-	980 ± 364
Cl <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	147,00	140 ± 30	140,00	182 ± 47	57 ± 23	972 ± 608
Na <sup>+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	86,00	76 ± 14	88,00	115 ± 18	51 ± 9	573 ± 153
B <sup>3+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	0,56	0,85 ± 0,16	0,90	0,82 ± 0,14	0,13 ± 0,06	1,36 ± 0,54
Alcalinidad (mg L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub> )	-	-	52,00	-	-	-
Índice de Langelier (LI)	-	0,06 ± 0,17	-0,10	0,18 ± 0,17	1,01 ± 0,26	-
RAS	4,00	5,3 ± 1,2	5,00	5,6 ± 1,5	1,1 ± 0,2	15,4 ± 10,6
pH	8,30	8,6 ± 0,2	8,20	8,7 ± 0,2	8,4 ± 0,1	7,4 ± 0,5



## Financial assessment of the restoration and maintenance of the Historic Garden “El Huerto de las Bolas”

### Evaluación económica de la restauración y mantenimiento del Jardín Histórico “El Huerto de las Bolas”

S. Gómez<sup>1\*</sup>, P. Satoca<sup>1</sup>, F.J. Alcón<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Economía de la Empresa, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena, Murcia, España.

\*samu.ct@gmail.com

#### **Abstract**

**In this study an economic viability analysis of the restoration and maintenance of a public good, such as the historical garden “El Huerto de las Bolas”, in the city of Cartagena, was carried out. For this analysis, the cost-benefit analysis methodology was applied for three scenarios with different time duration: short (3 years), medium (5 years) and long term (10 years). Results show the three scenarios are economically viable, with a Pay Back Period below 3 years. From these results, we can deduce that the benefits derived from the restoration and maintenance of a historical urban green space are greater than the costs of investment and maintenance. This way, an optimal state landscape of the garden is not only economically viable, but also enhances the benefits provided by its services.**

**Keywords:** Urban green space; Cost-benefit analysis; Net Present Benefit; Internal Rate of Return.

#### **Resumen**

**En este estudio se ha realizado un análisis de viabilidad económica de la restauración y puesta a punto de un bien público, como es el caso del Jardín Histórico “El Huerto de las Bolas” en la ciudad de Cartagena. Para este análisis se ha aplicado la metodología de análisis coste beneficio en tres escenarios de duración: corto (3 años), medio (5 años) y largo (10 años) plazo. Los resultados muestran que los tres escenarios son viables económicamente, situándose el plazo de recuperación de la inversión por debajo de los 3 años. De estos resultados se deduce que los beneficios derivados de la recuperación de este espacio verde urbano histórico son superiores a los costes de inversión y mantenimiento. De esta manera, un estado paisajístico del jardín óptimo, no solo es viable económicamente, sino que pone en valor los beneficios que proporcionan los servicios del mismo.**

**Palabras clave:** Espacio verde urbano; Análisis coste beneficio; Beneficio Actual Neto; Tasa Interna de Retorno.

## **1. INTRODUCCIÓN**

La restauración de un bien de interés público tiene como finalidad devolver al presente parte o la totalidad de los elementos que lo componen tal y como eran en un pasado. Lo que hace que un jardín se convierta en “histórico” es la idiosincrasia que alcance para el conjunto de la sociedad, por lo que podríamos ajustarnos a la definición de jardín histórico dada en la “Carta de

Florenia”, redactada por el Consejo Internacional de Monumentos Históricos y Sitios (ICOMOS) en 1981, que lo definía como “una composición arquitectónica y vegetal que, desde el punto de vista de la historia o del arte, presenta un interés público” [1]. Sin embargo, el concepto actual de jardín histórico ha ido cambiando a lo largo de los años, ya que se trata de entornos culturales modificados por el hombre a lo largo del tiempo, que mezclan diferentes estilos arquitectónicos con una gran diversidad biológica, haciendo de cada uno de ellos un enclave paisajístico único de interés público y común a la sociedad. Es por ello por lo que en el ámbito de la investigación surge la pregunta de si la restauración y mantenimiento de estos bienes de interés público son rentables para la sociedad.

En este contexto, este estudio tiene como objetivo evaluar la viabilidad económica, a corto, a medio y a largo plazo, de la reforma y mantenimiento de un jardín histórico en la ciudad de Cartagena, el denominado “Huerto de las Bolas”, que cuenta con más de 100 años de historia y con un estilo arquitectónico singular. Para lograr este objetivo se ha utilizado la metodología del análisis coste beneficio como herramienta financiera que permite medir la relación entre los costes y beneficios asociados al mantenimiento de la zona de estudio. La consecución del objetivo proporcionará información cuantitativa a los gestores de los espacios verdes urbanos que facilite su toma de decisiones acerca de la gestión de un espacio público con el interés de mejorar el bienestar del conjunto de los ciudadanos.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

El análisis coste-beneficio es un método de toma de decisiones que compara los beneficios y los costes de una iniciativa política o proyecto, considerando su vida útil y el coste de oportunidad de la inversión. Este análisis considera los flujos de económicos durante la iniciativa, por lo que es un instrumento apropiado para evaluar la viabilidad económica del mantenimiento de este jardín histórico para varios escenarios de duración.

Para la comparación económica de los costes y beneficios es necesario identificar y valorar los costes de inversión y todos los flujos de caja a lo largo de la vida de la inversión, estableciendo el horizonte de tiempo de la evaluación y fijando un índice de descuento que refleja el valor temporal del dinero. Esta información permite determinar los indicadores de viabilidad de la iniciativa, como el Beneficio Neto Actualizado (BAN), la Tasa Interna de Rentabilidad (TIR) y el Plazo de Recuperación (PB). El BAN es el sumatorio de todos los Flujos de Caja (CF<sub>n</sub>) generados en un cierto período de tiempo (n), aplicando la tasa de descuento o coste de oportunidad del inversor (i), menos los gastos de la inversión (k):

$$BAN = -k + \sum_{n=1}^n \frac{CF_n}{(1+i)^n}$$

donde CF<sub>n</sub> son los Flujos de caja esperados en el período de tiempo evaluado, es decir, los cobros menos los pagos, e (i) es la tasa de descuento, que se corresponde con la ganancia que un inversionista esperarí de una inversión alternativa con un nivel de riesgo similar, o la tasa de interés sobre la deuda. Para bienes ambientales, se considera una tasa de descuento ambiental [2].

La TIR, que comúnmente es usada para evaluar la conveniencia de inversiones, es la tasa de interés en la cual los flujos de caja descontados igualan al pago de la inversión. El período PB en un análisis de flujo de cajas descontados se refiere al período de tiempo requerido para la recuperación económica sobre una inversión, con el fin de 'recuperar' la cantidad correspondiente a la inversión original.

Además del BAN y el TIR existen otros indicadores para la evaluación económica de proyectos de rehabilitación de bienes públicos, y entre ellos se puede destacar la relación

beneficio-inversión. Cada uno de estos indicadores suponen conceptos que expresan el rendimiento económico de la inversión, y en base a estos se puede tomar la decisión de aceptar o rechazar la realización de una iniciativa política o proyecto [3].

### 2.1. Análisis de costes

El análisis de costes comprende el pago de la inversión y los pagos anuales asociados al mantenimiento de la misma durante su vida útil. El pago de la inversión es el capital requerido para la restauración del Jardín Histórico “El Huerto de las Bolas”. Los costes operacionales corresponden a los pagos asociados de mantenimiento del jardín para que su estado sea el óptimo paisajísticamente. Para este estudio, se estima una inversión inicial de 281.195 €, mientras que los pagos de mantenimiento se estiman en 162.689 €/año [4].

Estos costes de inversión han sido calculados en base a los trabajos de restauración planteados a los ciudadanos en el escenario de valoración a precios de 2012. Dichos trabajos consisten en la restauración de: láminas de agua, elementos de mobiliario, elementos de obra, pavimentos blandos, elementos de jardinería, la inclusión de nuevos elementos, como cartelería y un huerto de ocio, y su promoción turística.

### 2.2. Análisis de beneficios

El análisis de beneficios comprende los cobros esperados de su mantenimiento. Debido a que no existe un mercado para medir los beneficios derivados del disfrute de un jardín público de libre acceso, estos han sido obtenidos mediante el Método de Valoración Contingente en el que se estima el valor de los servicios proporcionados por este Jardín Histórico en base a la cantidad máxima de dinero que los ciudadanos están dispuestos a pagar para mantenerlo en unas condiciones óptimas. Según este estudio [4], el valor de los servicios derivados del mantenimiento del Huerto de las Bolas fue estimado en 1,21 €/visita, que considerando el número de visitas más frecuente que realizaría el entrevistado con este precio asciende a 6,65 €/año [4]. Para el agregado de la ciudad, el valor de los servicios proporcionados por el ecosistema del Huerto de las Bolas es de 1.464.100€ anuales, pero teniendo en cuenta que solo el 24 % de los encuestados acudiría al jardín, este valor ascendería a 351.384 €/año.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A la hora de evaluar la viabilidad económica de la remodelación y mantenimiento de este jardín histórico a corto, medio y largo plazo, se han estimado una serie de indicadores para los escenarios analizados, en función del periodo de tiempo que duraría la inversión realizada en el jardín y considerando una tasa de rentabilidad social del 4% [5] (Tabla 1). El escenario más favorable, con una duración de 10 años, proporciona una TIR del 66,7%, un BAN de 1.249.290 € y un periodo de recuperación de la inversión inferior a 3 años; mientras que el escenario más desfavorable (3 años), proporciona una TIR del 45,17% y un BAN de 242.451 €. Además, la relación beneficio-inversión de este proyecto alcanza valores superiores al 1, lo que no supondría, para el caso concreto de este estudio, una pérdida de bienestar global para el conjunto de la sociedad.

#### 4. CONCLUSIONES

Todos los indicadores empleados para la evaluación económica llevada a cabo en este estudio indican que la remodelación y puesta a punto de este jardín histórico es viable y rentable a corto, medio y largo plazo y supone una herramienta para que los gestores de los espacios verdes urbanos de la Ciudad de Cartagena puedan tomar la decisión de aceptar la realización de un proyecto de este tipo.

Aunque estos datos son exploratorios, y los beneficios ambientales podrían ser mayores de incluir otros servicios proporcionados por el jardín, como los servicios de regulación, se puede concluir que la remodelación y mantenimiento de este jardín histórico está justificada desde el punto de vista del conjunto de los ciudadanos, dado el corto periodo de tiempo en el que los beneficios superarían a los costes. Esto, además, justificaría a su vez la dotación de recursos humanos y económicos sobre este tipo de bienes públicos.

#### 5. REFERENCIAS

- [1] ICOMOS (1981). Carta de Florencia sobre Jardines Históricos. International Council of Monuments and Sites, Florencia, Italia. [https://www.icomos.org/images/DOCUMENTS/Charters/gardens\\_sp.pdf](https://www.icomos.org/images/DOCUMENTS/Charters/gardens_sp.pdf)
- [2] Alcon F., Martín-Ortega J., Pedrero F., Alarcon J.J., de Miguel M.D. (2013). Incorporating non-market benefits of reclaimed water into cost-benefit analysis: a case study of irrigated mandarin crops in southern Spain. *Water Resour. Manag.* 27(6): 1809-1820.
- [3] Muñante D.D. 2002. Manual de formulación y evaluación de proyectos. Universidad Autónoma de Chapingo, México.
- [4] Gómez S., Satoca P., Alcón F.J. 2016. Maintenance cost analysis of the Historic Garden “El Huerto de las Bolas”. Proceedings of the 5th Workshop on agri-food research=5th Workshop on Agri-food Research: WiA.16. Cartagena: Universidad Politécnica de Cartagena, CRAI Biblioteca, 2017. Pp. 167-170.
- [5] European Commission. 2014. Guide to Cost-Benefit Analysis of Investment Projects: Economic appraisal tool for Cohesion Policy 2014-2020. Directorate-General for Regional and Urban Policy, European Commission.

**Tabla 1.** Resultados del análisis de viabilidad económica de la restauración y mantenimiento del jardín

<b>n (años)</b>	<b>k (€)</b>	<b>CFn (€)</b>	<b>i (%)</b>	<b>BAN (€)</b>	<b>TIR (%)</b>
3				242.451	45,17
5	281.195	351.384	4	558.842	60,88
10				1.249.290	66,70

## Sensitivity to the Priestley-Taylor coefficient in the estimation of crop ET by remote sensing

## Sensibilidad al coeficiente de Priestley-Taylor en la estimación de ET del cultivo mediante satélite

J. A. Martínez-Pérez<sup>1\*</sup>, S. García-Galiano<sup>2</sup>, A. Baille<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidad Politécnica de Cartagena-UPCT, Grupo de I+D Gestión de Recursos Hídricos, Paseo Alfonso XIII, 52. 30203 Cartagena.

<sup>2</sup> Universidad Politécnica de Cartagena-UPCT, Grupo de I+D Gestión de Recursos Hídricos, Paseo Alfonso XIII, 52. 30203 Cartagena.

<sup>3</sup> Universidad Politécnica de Cartagena-UPCT, Departamento de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola. P. Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena.

\* joseangel.martinez@upct.es

### **Abstract**

From a graphical method based on the Priestley-Taylor (PT) equation, the actual ET is assessed, where dry soil and non-limiting water conditions are defined by surface temperature (LST) and vegetation index (VI), both variables obtained with remote sensing. Using flux towers measurements and Landsat 5TM images for the period 2009-11 a sensitivity analysis is performed with respect to the value of the coefficient of PT,  $\alpha$ . The results of the validation with respect to the ground true were satisfactory, with a ~10% error and a better fit of  $\alpha$  close to 1, a value different from the one generally used of 1.27, which could be a source of error, highlighting the importance of a mayor knowledge of the real value of  $\alpha$ .

**Keywords:** Semiarid areas; sensitivity analysis; Landsat; actual evapotranspiration; irrigation water applied.

### **Resumen**

A partir de un enfoque gráfico basado en la ecuación la Priestley-Taylor (PT) se determina la ET real mediante satélite, donde las condiciones de suelo seco y las condiciones no limitantes de agua se definen mediante la temperatura superficial (LST) y el índice de vegetación (VI), variables obtenidas desde teledetección. Usando mediciones de torre de flujo e imágenes Landsat 5TM para el período 2009-11 se realiza un análisis de sensibilidad con respecto al valor del coeficiente de PT,  $\alpha$ . Los resultados de la validación respecto a la realidad terreno fueron satisfactorios, con un error ~10% y un mejor ajuste de  $\alpha$  cercano a 1. Se resalta que este valor es diferente del generalmente usado 1,27, subrayando la importancia de un conocimiento más preciso del valor real de  $\alpha$ .

**Palabras clave:** zonas semiáridas; análisis de sensibilidad; Landsat; evapotranspiración real; aplicación de agua de riego.

## 1. INTRODUCCIÓN

[1] propusieron un algoritmo gráfico para la estimación de la evapotranspiración real (ET<sub>real</sub>), basado en la interpretación del espacio LST vs NDVI, cuyos límites pueden ser interpretados en términos de límites evaporativos: ET nula o límite superior (borde 'seco' o 'cálido' edge), y el inferior (borde 'húmedo' or 'frío') que representa el máximo de ET en la región. Un supuesto comúnmente empleado es que los píxeles del borde húmedo corresponden a áreas con igual ET a la 'Evaporación húmeda' (E<sub>w</sub>), definida como la evaporación de una superficie bien húmeda bajo condiciones de advección regional mínima [2], como sigue:

$$\lambda E_w = \alpha \left[ \frac{\Delta}{\Delta + \gamma} \right] (R_n - G) \quad (1)$$

siendo  $\Delta$  (Pa K<sup>-1</sup>) la pendiente de la curva de presión de vapor de saturación,  $\gamma$  la constante psicrométrica (Pa K<sup>-1</sup>),  $R_n$  la radiación neta,  $G$  el flujo del calor del suelo, y  $\alpha$  el coeficiente de Priestley-Taylor.

Una de las principales incertidumbres de este método radica en el valor real de  $\alpha$ . Un valor comúnmente aceptado es 1,27 que, sin embargo, se sabe que depende de las características y cobertura de la vegetación. En particular, [3] encontró que  $\alpha$  podía variar en un rango entre 0.9 a 1.5 dependiendo, entre otros factores, de la resistencia a la transferencia de vapor de agua de la superficie vegetal. Sin embargo, este valor podría presentar variaciones sistemáticas con el tiempo del día y la estación del año [3], y con el contenido de humedad del suelo [4].

Por este motivo, es primordial evaluar la sensibilidad del coeficiente para aumentar la exactitud en estimación de las distribuciones espaciales de ET. Para alcanzar este objetivo, se han utilizado varias imágenes Landsat TM (Thematic Mapper) del periodo 2009-2011, así como también torres de medidas de flujo o verdad-terreno en una zona regada del Campo del Cartagena (Sureste de España).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Materiales

Para la validación de la herramienta, se han utilizado medidas de ET<sub>real</sub> llevadas a cabo en dos fincas comerciales de naranjos, situadas en el Campo de Cartagena (Murcia), y equipadas con torres de medida de flujos que permiten registrar la ET con la técnica de covarianza de remolinos (eddy-covariance), además de medir otras variables de superficie.

La información satelital empleada consiste en 11 imágenes Landsat 5TM, tomadas entre 2009 y 2011, a las que se han aplicado correcciones radiométricas. Se ha trabajado con el producto MOD05 L2 de TERRA MODIS, necesario para la corrección por vapor de agua atmosférico, y con imágenes de turbidez atmosférica para el cálculo de la radiación solar incidente.

Además, se han descargado datos de temperatura del aire desde estaciones agrometeorológicas, lo que ha permitido el cálculo de la temperatura instantánea al momento de paso del satélite.

### 2.2 Algoritmo para el cálculo de ET<sub>real</sub>

Una vez determinadas las rectas que definen las condiciones de suelo seco (borde seco), y condiciones no limitantes de agua (borde húmedo), se ha deducido por interpolación el parámetro  $\alpha$  de la fórmula de Priestley-Taylor. De este modo, la Ecuación (1) quedaría representada por la siguiente ecuación:

$$\lambda ET = \phi \left[ \frac{\Delta}{\Delta + \gamma} \right] (R_n - G) \quad (2)$$

De donde  $\phi$  se obtiene con la relación siguiente:

$$\phi = \phi_{\max} \frac{DT_{\max} - DT_{\text{obs}}}{DT_{\max} - DT_{\min}} \quad (3)$$

Siendo  $DT = LST - T_a$ , aplicando la corrección propuesta por [5] para tener en cuenta la variabilidad espacial de la temperatura del aire. Se ha utilizado la diferencia de temperatura.

Por lo tanto, la radiación neta se obtiene a partir de la siguiente ecuación:

$$R_n = (1-a) \cdot R_s + L_d - L_{\text{up}} \quad (4)$$

Donde  $R_s$  constituye la radiación de onda corta incidente calculada según [6],  $a$  es el albedo, y  $L_d$  and  $L_{\text{up}}$  corresponden a la radiación de onda larga incidente y emitida respectivamente, calculadas según [7]. El flujo de calor por conducción  $G$  a la interfase superficie/atmósfera se ha calculado según [8], considerando que  $G$  es proporcional a  $R_n$ ; ( $G = \alpha R_n$ ) y que  $\alpha$  es una función lineal de  $EF$  ( $\alpha = a + bEF$ , con  $a = 0,22$  y  $b = -0,23$ ).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para identificar el valor adecuado de  $\alpha$  en el área de estudio se varía  $\alpha$  en un rango entre 0,7 y 1,3, con incrementos de 0,1, para identificar el mínimo valor del Error Medio Cuadrático (RMSE) entre valores estimados y observados de ET. Los resultados demostraron que, para ambas parcelas, el RMSE fue mínimo para valores de  $\alpha$  cercanos a 1.1 (Figura 1). Si se comparan los errores entre  $\alpha = 1$  y  $\alpha = 1,3$  (Tabla 1), el valor de  $\alpha = 1$  presenta menores valores de errores respecto al valor de  $\alpha = 1,3$ , como muestra la Tabla 1. Esto demuestra que el valor del parámetro  $\alpha$  tiene importante influencia sobre ET.

De acuerdo a los resultados obtenidos, un valor cercano a  $\alpha = 1$  puede explicarse por el hecho de que la mayor parte del borde húmedo del espacio  $LST-NDVI$  corresponde a cultivos de regadío, que en la zona son cítricos y cultivos hortícolas con bastante elevada resistencia a la transferencia de vapor agua ( $r_s$ ). [3] demostró que el control de evaporación en tierras con vegetación depende fuertemente de las características fisiológicas de la vegetación, en particular del valor de la superficie de la resistencia,  $r_s$ . Igualmente mostró que el valor  $\alpha$  en el momento del paso del satélite (entre las 10 y 11 p.m.) es cercano a 1 cuando  $r_s$  es del rango de 150 a 250 s/m, que es del orden de magnitud de  $r_s$  para cítricos como los de la zona de estudio.

### 4. CONCLUSIONES

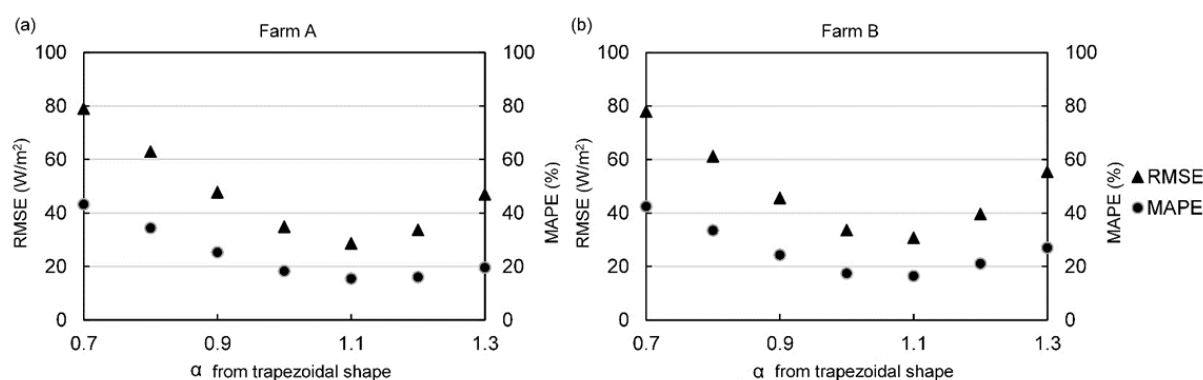
El estudio pone de relieve la importancia de un conocimiento más preciso del coeficiente PT para el cálculo de la ET real. Una estimación razonable de  $\alpha$  podría hacerse recogiendo información del tipo de vegetación o cultivos, y la superficie de resistencia, por ejemplo, con mapas de uso de suelo. A partir del conocimiento de  $r_s$  media, un valor medio del valor de  $\alpha$  podría ser calculado y utilizarse como un valor más realista del coeficiente PT para el cálculo de ETreal.

### 5. AGRADECIMIENTOS

Se agradece la financiación recibida de los siguientes proyectos de I+D: EC-DG ENV ref. 241559. REDSIM, EU FP7-245159 SIRRIMED, y CGL2012-39895-C02-01 HYDROCLIM.

## 6. REFERENCIAS

- [1] Jiang L., Islam S., 2001. Estimation of surface evaporation map over southern GreatPlains using remote sensing data. *Water Resour. Res.* 37(2): 329-340.
- [2] Priestley C.H.B., Taylor R.J. 1972. On the assessment of surface heat flux and evaporation using large-scale parameters. *Mon Weather Rev.* 100: 81-92.
- [3] De Bruin H. 1983. A Model for the Priestley-Taylor Parameter  $\alpha$ . *J. Clim. Appl. Meteorol.* 22: 572-578.
- [4] Davies J.A., Allen C.D. 1973. Equilibrium, potential and actual evaporation from cropped surface in southern Ontario. *J. App. Meteorol.* 12: 649-657.
- [5] Kalma J.D., McVicar T.R., McCabe M.F. 2008. Estimating land surface evaporation: a review of methods using remotely sensed surface temperature data. *Surv. Geophys.* 29: 421-469.
- [6] Hofierka J, Suri M. 2002. The solar radiation model for Open source GIS: implementation and applications. Proceedings of the Open source GIS - GRASS users conference 2002 - Trento, Italy, 11-13 September. Available in <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.19.9831&rep=rep1&type=pdf> (accessed on 23 12 2016)
- [7] Xiong Y.J., Qiu G.Y., 2014. Simplifying the revised three-temperature model for remotely estimating regional evapotranspiration and its application to a semi-arid steppe. *Int. J. Remote Sens.* 35(6): 2003-2027.
- [8] Tanguy M., Baille A., González-Real M., Lloyd C., Cappelaere B., Kergoat L., Cohard J. 2012. A new parameterisation scheme of ground heat flux for land surface flux retrieval from MODIS products. *J. Hydrol.* 454-455: 113-122



**Figura 1.** Evolución de del Error Medio Cuadrático y Error Medio Porcentual Absoluto

**Tabla 1.** Errores en la evaluación de ET

	Parcela	Error Medio cuadrático (W/m <sup>2</sup> )	Error absoluto medio (W/m <sup>2</sup> )	Error medio porcentual absoluto (%)
$\alpha=1.3$	A	47,0	37,3	19,6
	B	55,3	50,6	27,0
$\alpha=1$	A	34,9	29,8	18,3
	B	33,6	26,4	17,4



# Implementation and evaluation of a wireless vision node for water management in agriculture

## Implantación y evaluación de un nodo inalámbrico de visión para la gestión del agua en agricultura

J.M. González-Esquivá<sup>1\*</sup>, G. García-Mateos<sup>2</sup>, A. Ruiz-Canales<sup>3</sup>, J.M. Molina-Martínez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Grupo I+D+i Ingeniería Agromónica y del Mar. DIAEA. Área de Ingeniería Agroforestal. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica. Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena (Murcia).

<sup>2</sup>Departamento de Informática y Sistemas. Facultad de Informática. Universidad de Murcia, Campus Universitario de Espinardo, 30100 Murcia (Murcia).

<sup>3</sup>Agua y Energía para una Agricultura Sostenible. Escuela Politécnica Superior de Orihuela. Universidad Miguel Hernández de Elche. Ctra. de Beniel, km 3.2, 03312 Orihuela (Alicante).

\*jgonzalez1690@gmail.com.

### **Abstract**

**In this paper, a novel system to obtain the vegetation cover on an unattended, simple and automatic way is presented. It is composed of a set of low-cost camera modules that communicate with a cloud-computing server. The server after receiving and processing performing computer vision algorithms determines an estimate of water requirements, storing all data in a secure database in a web portal.**

**Keywords:** Arduino; Alometría; Photography.

### **Resumen**

**Por medio de la presente investigación se ha desarrollado un sistema novedoso para obtener, de una forma desatendida, sencilla y automática, la cobertura vegetal a partir de un sistema compuesto por un nodo de visión con cámara fotográfica de bajo coste comunicado con un sistema cloud-computing. De esta forma, el servidor, tras recibir y procesar las imágenes, y aplicando algoritmo de visión, determinará la cobertura vegetal para determinar el balance hídrico de la planta. Los datos son almacenados en una segura base de datos en un portal web.**

**Palabras clave:** Arduino; Alometría; Fotografía.

## **1. INTRODUCCIÓN**

La estimación de los requerimientos hídricos en los cultivos es la etapa principal en el diseño de un sistema de riego, siendo cada vez más precisa con el avance de la tecnología. Por medio de funciones alométricas podemos relacionar diversos parámetros de una planta sencillos de medir (altura, volumen, superficie, etc.) con otras variables difíciles de medir como la biomasa o los coeficientes de evapotranspiración [1].

Se ha demostrado en diversos estudios que, tras realizar una calibración, se pueden aplicar funciones alométricas que relacionan la fracción de la cobertura vegetal con la profundidad reticular [2] o con la Evapotranspiración relativa [3,4]. En este sentido se han realizado diversos trabajos que facilitan la obtención de la fracción de la cobertura vegetal a partir de fotografías, aplicando técnicas de segmentación.

El objetivo de nuestro trabajo es desarrollar un sistema que automatice todo el proceso utilizando cámaras de bajo coste que obtengan la imagen en el campo, e integrarlo en un nodo de comunicación inalámbrico que transmita la imagen para su posterior procesamiento para la obtención de la fracción de cobertura vegetal por medio de la técnica Fuzzy C-Means (FCM) [5] y de histogramas de color, considerando los buenos resultados obtenidos en otras aplicaciones previas [6].

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

El nodo de visión consta de una placa arduino DUE con una cámara OV706(CMOS,TTL), con un procesador Atmel SAM3X8E ARM Cortex-M3 CPU y un módulo WIFI ESP8266, con un sistema de respaldo SD de 8Gb, comunicándose por un nodo central a un servidor cloud-computing, PC AMD Quad Core Processor (2 Ghz) con servidor Apache, PHP y la librería Magick (Studio, 2008). El proceso completo se ha realizado siguiendo los pasos que se presentan a continuación.

### 2.1. Nodo de visión

Toma de la imagen 320x240, con compresión del 90%. Para la selección de apertura del objetivo, se tomará previamente una lectura de la intensidad luminosa, aplicando los filtros preconfigurados acordes al nivel de luz. Por último se ajustan las ganancias de color por temperatura de color apoyados por filtros de infrarrojos y ultravioleta, para un ajuste más fino. El archivo se almacenará en un fichero CSV en la tarjeta SD del nodo de visión, sincronizando el archivo a la nube a continuación.

### 2.2 Servidor

Escalado de imagen a una resolución de (150x150) píxeles y corrección de la imagen por el sistema de 4 puntos, aplicando una transformación para corregir la distorsión por ángulo de visión o lente. Para ello se realiza una transformación bidimensional proyectiva.

### 2.3 Aplicación conjunta de algoritmos de segmentación

Aplicación conjunta de algoritmos de segmentación, para minimizar los efectos de una sobreexposición de luminosidad o ajuste de ganancia de colores, validándose la foto solo si se produce una discrepancia superior al 5%. Cuando las fotografías se realizan en las condiciones ambientales correctas, las dos técnicas coinciden en los valores.

Por un lado se utilizará el software CAPS® (Clasificación Automática de Plantas y Suelo) que implementa el método de segmentación binaria de imágenes por color [8] que incluye el recorte de imágenes y el entrenamiento de modelos de color [9]. El programa incluye varios modelos genéricos de planta/suelo, y se pueden crear otros modelos nuevos. El peso principal de la segmentación es el color.

Por otro lado, se aplica en paralelo el algoritmo fuzzy C-means [10]. La obtención de la segmentación se produce por la agrupación de los colores. La principal ventaja de este método es que no requiere de la intervención del humano para su aplicación aunque presenta un alto coste de computación que requiere reducir el tamaño de los archivos, aunque facilita una segmentación por agrupación de píxeles, la forma.

### 2.4 Morfología. Erosión y dilatación.

A partir de los elementos estructurantes principales, se eliminan por erosión aquellos grupos de píxeles que estén fuera de los objetos y se incluyen por dilatación aquellos píxeles que se encuentren en el interior de los objetos.

En un primer cultivo o temporada, se almacenan los datos obtenidos junto valores reales de una estación de Bowen para realizar un calibrado para la obtención de la curva de crecimiento.

Para su uso en posteriores cultivos, pudiéndose obtener las necesidades hídricas de la planta a partir de la cobertura vegetal [10] y ajustar los parámetros de riego.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Se ha podido verificar el buen comportamiento de los nodos flexibles, independientemente del entorno, con una buena fiabilidad, haciendo viable su implementación a unas resoluciones pequeñas (320x120 píxeles), con un tamaño de archivo de 50-80 kb, facilitando su almacenamiento y tratamiento en servidores externos, con un peso medio total por solicitud de 100 kb. Dado el poco peso de los archivos, se ha podido utilizar una conexión 3G simyo, 1 GigaByte, que posibilita el envío de 10.000 fotografías con un precio 1€ / mes.

Un inconveniente que se ha presentado al trabajar con el Arduino, es sus pocas prestaciones de memoria y velocidad, requiriendo una velocidad de captura y envío de imágenes 5-10s, requiriendo la utilización de empaquetamiento y almacenamiento en tarjetas SD. En aquellos casos de que los ficheros tengan un peso elevado, se podrá empaquetar el fichero en varias partes, realizándose una reconstrucción completa en el servidor.

El sistema, al estar programado en PHP, ha facilitado implementarlo en un servidor Apache, donde se puede integrar en un hosting y realizar un sistema cloud computing con monitorización y evolución del cultivo (Fig. 1).

### **4. CONCLUSIONES**

En términos generales el sistema es un sistema flexible y económico con una gran escalabilidad, integración y adaptabilidad. Al ser un sistema configurado como servidor-cliente, esto permite que la unidad del servidor pueda soportar las acciones más pesadas de procesamiento sin necesidad de estar ubicado en el campo, permitiendo disminuir los requisitos de los equipos situado en el campo y por consiguiente la utilización de las tarjetas controladoras Arduino de bajo coste, las cuales forman un sistema ligero de procesamiento destinado solamente para controlar los parámetros de la cámara y la transmisión de las imágenes.

Otra ventaja es la utilización de la red para el traspaso de otras variables obtenidas por sensores diferentes o control de sistemas automatizados que son fácilmente integrables en las tarjetas Arduino (55 E/S), integrándose en el sistema SCADA ejecutado en la nube, de esta forma los usuarios podrán acceder de una forma sencilla por medio de un navegador web.

La utilización de las placas ESP8266 al disponer de una memoria de 4Mb, han facilitado el control y gestión de la memoria por parte de los Arduinos, impidiendo bloqueos del sistema por falta de memoria así como la falta de multiproceso en el almacenamiento y envío de ficheros.

El inconveniente principal es la notable variación del histograma de la imagen dependiendo de la exposición de la luz, siendo necesaria una calibración precisa dependiendo del nivel de luminosidad, aunque la utilización de sensores de nivel de luminosidad disminuye las incidencias.

### **5. AGRADECIMIENTOS**

Los autores queremos agradecer la asistencia técnica y la cesión de material por parte Telenatura EBT, S.L.

### **6. REFERENCIAS**

[1] White J.F., Gould S.J., 1965. Interpretation of the coefficient in the allometric. *Am.Nat.* 99 (904): 5-18.

- [2] Escarabajal-Henarejos D., Molina-Martínez JM., Fernández-Pacheco D.G., Cavas-Martínez F., García-Mateos G. 2015. Digital photography applied to irrigation management of Little Gem lettuce. *Agric. Water Manag.* 151: 148–157.
- [3] Fernández-Pacheco DG., Escarabajal-Henarejos D., Ruiz-Canales A., Conesa J., Molina-Martínez JM. 2014. A digital image-processing-based method for determining the crop coefficient of lettuce crops in the southeast of Spain. *Biosyst. Eng.*, 117:23–34.
- [4] González-Esquiva J.M., García-Mateos G., Escarabajal-Henarejos D., Hernández-Hernández J.L., Ruiz-Canales A., Molina-Martínez J.M. 2017. A new model for water balance estimation on lettuce crops using effective diameter obtained with image analysis. *Agric. Water Manag.* 183:116-122.
- [5] Bezdek J.C. 1973. *Fuzzy Mathematics in Pattern Classification*. Doctoral Dissertation. Cornell University, Ithaca, NY.
- [6] Hernández-Hernández J.L., Ruiz-Hernández J., García-Mateos G., González-Esquiva J.M., Ruiz-Canales A., Molina-Martínez J.M. 2017. A new portable application for automatic segmentation of plants in agriculture. *Agric. Water Manag.* 183:146-157.
- [7] García-Mateos G., Hernández-Hernández J.L., Escarabajal-Henarejos D., Jaén-Terrones S., Molina-Martínez J.M. 2015. Study and comparison of colormodels for automatic image analysis in irrigation management applications. *Agric. Water Manag.* 151, 158–166.
- [8] Hernández-Hernández J.L., García-Mateos G., González-Esquiva J.M., Escarabajal-Henarejos D., Ruiz-Canales A., Molina-Martínez J.M. 2016. Optimal color space selection method for plant/soil segmentation in agriculture. *Computers and Electronics in Agriculture* 122: 124-132.
- [9] González-Esquiva J.M., García-Mateos G., Hernández-Hernández J.L., Ruiz-Canales A., Escarabajal-Henarejos D., Molina-Martínez J.M. 2017. Web application for analysis of digital photography in the estimation of irrigation requirements for lettuce crops. *Agric. Water Manag.* 183: 136-145.
- [10] Escarabajal Henarejos D., Martínez Garrido P., Molina Martínez J.M., Ruiz Peñalver L., Ruiz Canales A. 2013. Estimación del coeficiente de cultivo en lechuga (*Lactuca sativa* cv. 'Hierro') mediante tratamiento digital de imágenes. VI Jornadas de Introducción a la Investigación de la UPCT. Pp. 52–54.

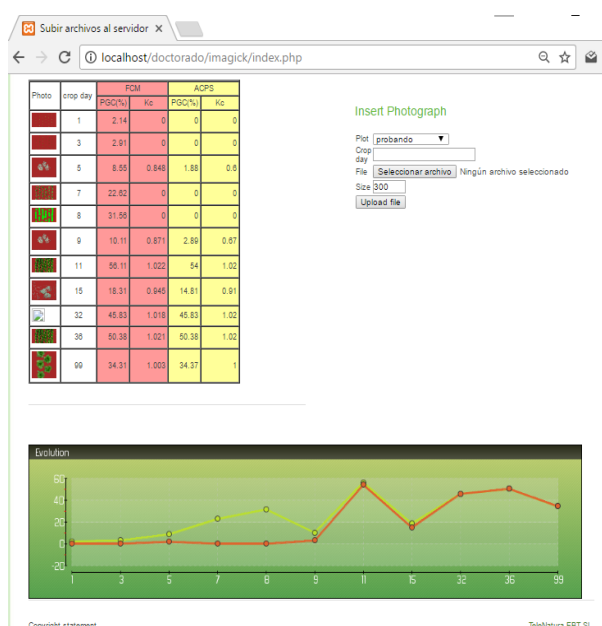


Figura 1. Captura de pantalla. Interface de subida de archivo



# ORAL SESSION III:

## Plant Production Technology and Engineering

## Assessment of the combined use of MSW and autochthonous tree species for the phytomanagement of mine wastes under semiarid climate.

## Evaluación del uso combinado de RSU y especies arbóreas autóctonas para el fitomanejo de residuos mineros en clima semiárido.

D. Martínez-Oró<sup>1\*</sup>, I. Párraga-Aguado<sup>1</sup>, H.M. Conesa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria. Área de Edafología y Química Agrícola. Universidad Politécnica de Cartagena-UPCT. Paseo Alfonso XIII, 48, Cartagena, 30203 Murcia, España.

\*duli.martinez@upct.es

### **Abstract**

Phytomanagement is considered a suitable tool to reduce the environmental risks of abandoned mine tailings. Organic amendments and trees have been successfully used on metal contaminated land. The goal of this work was to assess the effects of Municipal Solid Waste (MSW) addition on plant growth and metal(loid) partitioning in two tree plant species (*P. halepensis* and *T. articulata*) growing on mine tailings. In order to achieve the objective of this work a pot experiment was carried out. The MSW improved soil fertility parameters and thus, plant growth in both plant species but also metal translocation in *P. halepensis*. It was concluded that the positive effects of MSW on plant growth may justify its employment in the phytomanagement of abandoned mine tailings

**Keywords:** phytostabilisation; heavy metals; stable isotopes; organic amendments.

### **Resumen**

El fitomanejo se considera una técnica adecuada para reducir los riesgos ambientales de depósitos mineros abandonados. Las enmiendas orgánicas y el empleo de árboles se han utilizado con éxito en estos suelos contaminados. El objetivo de este trabajo fue evaluar la adición de un residuos sólido urbano (RSU) en el crecimiento y fraccionamiento de metal(oid)es en dos especies arbóreas (*P. halepensis* y *T. articulata*) creciendo en residuos mineros. Para alcanzar los objetivos de este trabajo se llevó a cabo un experimento en macetas. El RSU mejoró los parámetros de fertilidad de suelo y aumentó la biomasa de ambas especies, aunque favoreció una mayor translocación de metales en *P. halepensis*. Se concluyó que el uso para el fitomanejo de residuos mineros de *P. halepensis* y *T. articulata* puede ser apropiado acompañado del uso de esta enmienda.

**Palabras clave:** fitoestabilización; metales pesados; isótopos estables; enmiendas orgánicas.

## 1. INTRODUCTION

Phytomanagement is considered a suitable tool to reduce the environmental risks of abandoned mine tailings [1]. This technology uses plants to immobilize metal(loid)s within the rhizosphere and mitigate the erosion. Organic amendments have been used for improving plant growth on metal contaminated soils [2]. Among the available amendments, municipal solid wastes (MSW)

might be an interesting alternative for recycling urban wastes [3]. Trees have been successfully used in phytostabilisation of meta(loid)s contaminated land [1]. Their extensive root system fixes soil particles and immobilizes meta(loid)s.

The main goal of this work was to assess the effects of MSW addition on plant growth and metal(loid) partitioning in two tree plant species growing on mine tailings. For that purpose, a pot experiment was carried out employing two native tree species, *Pinus halepensis* and *Tetraclinis articulata*. Our hypothesis was that the MSW amendment might improve tree nutrition, plant growth and, as a result, decrease metal(loid)s uptake by the trees.

## 2. MATERIALS AND METHODS

A pot experiment was carried out for fifteen months in a greenhouse. The soil treatments tested were: T, unamended neutral pH mine tailings, and TR, neutral pH mine tailings amended with MSW (10% w/w) provided by the local waste treatment plant. A chemical characterisation of T, R and TR was performed. Seedlings of *P. halepensis* and *T. articulata* were transplanted into the pots. The resulting treatments were: PT, *P. halepensis* on unamended tailings; PTR, *P. halepensis* on amended tailings; TT, *T. articulata* on unamended tailings; and TTR, *T. articulata* on amended tailings. Plants were harvested at the end of the experiment and separated into different parts: roots, trunk, branches and leaves. Nutrient and metal(loid) concentrations were measured. Leaf isotopic composition ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ) was also analysed.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

The tailings samples showed high total metal(loid) concentrations (in mg kg<sup>-1</sup>: 430 As, 35 Cd, 120 Cu, 10100 Mn, 6200 Pb, 10000 Zn). Amended treatments (TR) showed an improvement of soil fertility parameters (*e.g.* OC, DOC) but also an increase of EC or some water extractable metals concentrations (Mn) (Table 1).

The total dry biomass in the amended treatments, PTR and TTR, was around 4-fold higher than in the not amended ones (Figure 1). Phosphorus was the only nutrient that showed a significant increase (Table 2) in PTR, which could indicate P as a major limiting factor for pines growing in the non amended tailings.

Metal(loid) accumulation was higher in roots of PT than PTR, probably due to a dilution effect caused by higher plant biomass in the amended treatments [4]. This was similar for TT and TTR, except in Cu and Mn which showed higher concentration in TTR roots (Table 3).

Isotope leaf signature has been proposed for the assessment of the ecophysiological status of plants. In order to discern whether these differences on  $\delta^{13}\text{C}$  are driven by changes in stomatal conductance or by biochemical factors affecting the rubisco activity, Scheidegger [5] proposed a conceptual model. No differences in  $\delta^{18}\text{O}$  were found in any of the two studied plant species probably due to similar source of water, humidity and limited depth of the soil in each treatment. Therefore, the significant difference found in  $\delta^{13}\text{C}$  between PT and PTR plants might indicate a higher photosynthetic capacity of the PT pine trees (Table 2). Differences on  $\delta^{13}\text{C}$  according to the leaf age on pine trees were showed by Parraga-Aguado et al. [6] where young needles from pine trees growing on mine tailings showed higher  $\delta^{13}\text{C}$  than older needles, and that was also related to a higher photosynthetic capacity of the former. In the case of *T. articulata*, no significant differences were found in  $\delta^{13}\text{C}$  or  $\delta^{18}\text{O}$  between treatments, which may indicate that the processes involved in transpiration and photosynthesis are less impacted by the different soil treatments in this plant species. The differences found in  $\delta^{15}\text{N}$  might be mainly from the different sources of N in each treatment (Table 3). The foliar  $\delta^{15}\text{N}$  in plant reflects the N source which plants employ: the higher foliar  $\delta^{15}\text{N}$  in the unamended treatments may indicate that  $\text{NH}_4^+$  is the main source for N as it is known that conifer preferentially uptake this ion, which is  $\delta^{15}\text{N}$  enriched [7]. However, lower foliar  $\delta^{15}\text{N}$  in the amendment treatments may indicate that  $\text{NO}_3^-$  has become the main

source of N. This may be due to the higher microbial activity promoted by higher DOC in amended treatments which resulted in the <sup>15</sup>N enrichment in microbial biomass (microorganism use preferentially NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) and the generation of water soluble N, depleted in <sup>15</sup>N, mainly NO<sub>3</sub><sup>-</sup> [8].

#### 4. CONCLUSIONS

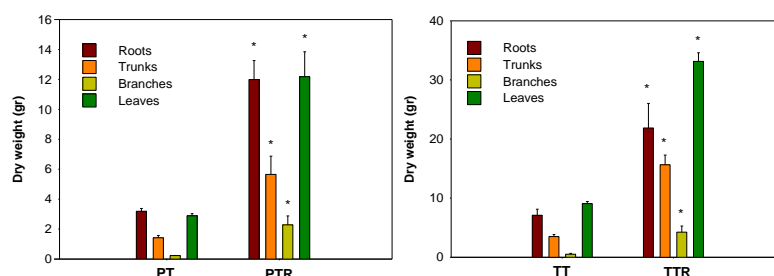
*P. halepensis* and *T. articulata* could be suitable species for phytostabilisation purposes in abandoned mine tailings due to low metal uptake and suitable plant growth, especially, in combination with organic amendments, such as municipal solid wastes.

#### 5. ACKNOWLEDGMENT

This project has been funded by MINECO-FEDER (CGL2014-54029-R, Project ECOMIN) and Seneca Foundation (19248/PI/14). Obdulia Martínez holds a FPI contract (BES-2015-075838) from MINECO.

#### 6. REFERENCES

- [1] Parraga-Aguado I, Querejeta JI, González-Alcaraz MN, Jiménez-Cárceles FJ, Conesa HM. 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.
- [2] Mendez M.O., Maier R.M., 2008. Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments – An emerging remediation technology. *Environ. Health Perspect.* 116: 278–283.
- [3] He X.-T., Traina S.J., Logan T.J. Chemical properties of municipal solid waste composts. *J. Environ. Qual.* 21: 318-329.
- [4] Jarrell W.M., Beverly R.B. 1981. The Dilution Effect in Plant Nutrition Studies. *Adv. Agron.* 34: 197–224.
- [5] Scheidegger Y., Saurer M., Bahn M., Siegwolf, R. 2000. Linking Stable Oxygen and Carbon Isotopes with Stomatal Conductance and Photosynthetic Capacity: A Conceptual Model. *Oecologia* 125, 350–357.
- [6] Parraga-Aguado I, Querejeta JI, González-Alcaraz MN, Jiménez-Cárceles FJ, Conesa HM. 2014. Metal(loid) allocation and nutrient retranslocation in *Pinus halepensis* trees growing on semiarid mine tailings. *Sci Total Environ.* 485-486: 406-414.
- [7] Högborg P. 1997. <sup>15</sup>N natural abundance in soil–plant systems. *New Phytologist* 137: 179–203.
- [8] Lerch TZ, Nunan N, Dignac MF, Chenu C, Mariotti A. 2011. Variations in microbial isotopic fractionation during soil organic matter decomposition. *Biogeochemistry* 106:5–21.



**Figure 1.** Biomass of each plant organ of *Pinus articulata* and *Tetraclinis articulata*. “\*” indicates significant differences (p < 0.05). Bars on columns are standard error.



**Table 1.** Soil characterization at the beginning of the experiment. “\*” indicates significant differences ( $p < 0.05$ ) between T and T+R treatments (N=5). Data are average  $\pm$  standard error.

Soil parameter	Units	Treatments		
		T	T+R	R
pH (1:5)	-	7.14 $\pm$ <0.1	6.95 $\pm$ <0.1	5.34 $\pm$ 0.12
EC (1:5)	dS m <sup>-1</sup>	2.41 $\pm$ <0.01	3.02 $\pm$ 0.02	4.06 $\pm$ 0.15
OC	g kg <sup>-1</sup>	1.41 $\pm$ 0.1	12.6 $\pm$ 0.4	160 $\pm$ 5
DOC	mg kg <sup>-1</sup>	29.04 $\pm$ 0.7	686 $\pm$ 40	25220 $\pm$ 1032
N total	g kg <sup>-1</sup>	0.74 $\pm$ 0.1	0.94 $\pm$ <0.1	12 $\pm$ 0.5
Available-P		2.5 $\pm$ 0.3	4.4 $\pm$ 0.3	Not available
Water extractable ions (1:5)	Cl <sup>-</sup>	1.50 $\pm$ <0.1	103 $\pm$ 3	1150 $\pm$ 20
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.08 $\pm$ 0.1	1.04 $\pm$ <0.1	10 $\pm$ 0.3
	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1472 $\pm$ 8	1540 $\pm$ 11	690 $\pm$ 19
	Na <sup>+</sup>	1.41 $\pm$ <0.1	86.9 $\pm$ 3	970 $\pm$ 18
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.41 $\pm$ <0.1	0.58 $\pm$ <0.1	12 $\pm$ 2
	K <sup>+</sup>	1.74 $\pm$ <0.1	45.8 $\pm$ 2	640 $\pm$ 13
	Ca <sub>2</sub> <sup>+</sup>	577 $\pm$ 3	575 $\pm$ 3	315 $\pm$ 12
	Mg <sub>2</sub> <sup>+</sup>	18.5 $\pm$ 0.4	31.6 $\pm$ <0.1	150 $\pm$ 6
Water extractable metals (1:5)	As	7.64 $\pm$ 0.7	149 $\pm$ 9	200 $\pm$ 11
	Cd	<10	33.7 $\pm$ 1	3040 $\pm$ 62
	Cu	<10	816 $\pm$ 57	44150 $\pm$ 4703
	Mn	106 $\pm$ 9	11321 $\pm$ 721	161700 $\pm$ 9255
	Pb	<10	103 $\pm$ 6	6600 $\pm$ 321
	Zn	430 $\pm$ 27	1870 $\pm$ 110	196000 $\pm$ 5686

**Table 2.** Nutrients and stable isotopes foliar concentration. “\*” indicates significant differences ( $p < 0.05$ ). Data are averages  $\pm$  standard error (N=4).

Foliar composition	Units	Treatments			
		TP	TPR	TT	TTR
C	g kg <sup>-1</sup>	491	485	450	444
N		9.5	7.4	6	5.5
Na	mg kg <sup>-1</sup>	1640	1396	744	1082
K		4011	4250	5303	4853
Ca		3774	4096	14617	11793
Mg		2713	3342	1381	1294
P		297	525	470	483
$\delta^{13}C$		-29.67	-30.64	-28.65	-27.92
$\delta^{15}N$		4.59	1.62	5.09	2.86
$\delta^{18}O$		30.01	29.95	36.69	36.02

**Table 3.** Metal(loid)s concentration in root, trunk, branch and leaf. “\*” indicates significant differences ( $p < 0.05$ ). Data are averages  $\pm$  standard error (N=4).

Treatments	Organ	Metal(loid)s in plant (mg kg <sup>-1</sup> )					
		Cd	Cu	Mn	Pb	Zn	As
PT	Root	1.61	14.41	118.14	289.61	515.27	0.34
PTR	Root	1.15	10.54	104.08	147.43	309.70	0.26
PT	Trunk	0.77	2.68	56.72	10.77	54.74	0.03
PTR	Trunk	2.15	2.96	56.02	3.21	40.66	0.01
PT	Branch	0.65	5.12	55.39	25.11	56.13	0.03
PTR	Branch	2.38	4.59	56.11	2.23	48.94	0.01
PT	Leaf	0.08	2.48	153.14	1.75	84.03	0.01
PTR	Leaf	0.37	3.51	288.28	5.72	111.65	0.01
TT	Root	2.39	9.70	143.04	136.03	326.73	2.57
TTR	Root	1.45	23.65	146.07	127.80	197.96	0.35
TT	Trunk	0.79	2.41	8.95	4.30	15.22	0.01
TTR	Trunk	0.57	2.27	9.03	6.93	11.46	0.00
TT	Branch	0.79	2.41	8.95	4.30	15.22	0.01
TTR	Branch	0.46	3.12	17.20	2.21	20.62	0.00
TT	Leaf	0.98	2.01	37.16	7.35	30.25	0.01
TTR	Leaf	0.55	1.87	45.90	4.07	29.09	0.01

## Evaluation of the heritability in emamectin benzoate resistance of *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae)

## Evaluación de la heredabilidad en la resistencia a emamectina benzoato de *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae)

V. Balanza<sup>1\*</sup>, J.E. Mendoza<sup>1</sup>, P. Bielza<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Producción Vegetal, ETSIA. Universidad Politécnica de Cartagena-UPCT, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203. Cartagena, España.

\*virgibalanza@hotmail.com

### Abstract

*Orius laevigatus* is a natural enemy used as biological control agent. One of the problems in integrated pest management (IPM) is the compatibility between natural enemies and some phytosanitary treatments such as the emamectin benzoate. In this way, it would be interesting to create a population of *O. laevigatus* resistant to emamectin, so that both could be compatible in an IPM program. In this study the heritability of the emamectin resistance of *O. laevigatus* was evaluated. After 8 generations, the LC<sub>50</sub> value increased from 5.43 (1.98-9.92) mg L<sup>-1</sup> to 42.98 (15.55-73.77) mg L<sup>-1</sup>. There were significant differences between generations. On the other hand, the heritability values were 0.16 and 0.07 for (G<sub>0</sub>-G<sub>6</sub>) and (G<sub>6</sub>-G<sub>8</sub>), respectively.

**Keywords:** IPM; resistance; phytosanitary.

### Resumen

*Orius laevigatus* es un enemigo natural usado en control biológico de plagas. Uno de los principales problemas de la gestión integrada de plagas (GIP) es la compatibilidad entre enemigos naturales y algunos tratamientos fitosanitarios como la emamectina benzoato. De esta manera, sería interesante crear una población de *O. laevigatus* resistente a emamectina, para que ambos pudieran ser compatibles en un GIP. El presente estudio se llevó a cabo para evaluar la heredabilidad de la resistencia a emamectina de *O. laevigatus*. Después de 8 generaciones el valor de la CL<sub>50</sub> aumentó de 5,43 (1,98-9,92) mg L<sup>-1</sup> a 42,98 (15,55-73,77) mg L<sup>-1</sup>, existiendo diferencias significativas entre ambas. Por otro lado, los valores de la heredabilidad fueron de 0,16 y de 0,07 para (G<sub>0</sub>-G<sub>6</sub>) y (G<sub>6</sub>-G<sub>8</sub>), respectivamente.

**Palabras clave:** GIP; resistencia; fitosanitario.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) es un agente de control biológico que puede aparecer de manera natural en algunos cultivos y que se encuentra también en distintas plantas silvestres del área mediterránea. Destaca por ser un efectivo depredador del trips *Frankliniella occidentalis* (Pergande) en invernaderos y cultivos al aire libre [1].

Debido a la dificultad de no poder controlar a algunas plagas solamente con productos químicos, se desarrolló un programa de gestión integrada de plagas (GIP). El principio clave de la GIP es conseguir que los insecticidas utilizados no afecten a los agentes de control biológico, lo que requiere un buen conocimiento de cómo utilizar los productos químicos [2]. Un insecticida que se utiliza junto con los enemigos naturales en programas de GIP es emamectina benzoato (emamectina), el cual es tóxico para *O. laevigatus* como se muestra en algunos estudios [3], por lo que sería interesante crear una población de este insecto resistente a emamectina, de manera que ambos pudieran ser compatibles en un GIP.

El éxito de las técnicas de manejo de la resistencia a insecticidas depende de muchos factores, tales como entender la herencia y los mecanismos de resistencia [4]. Los niveles de reconocimiento y manejo de la resistencia pueden ser mejorados mediante la información apropiada sobre el modo de heredar la resistencia a un determinado insecticida [5]. El presente estudio se llevó a cabo para evaluar la heredabilidad de la resistencia a emamectina en *O. laevigatus*.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Insectos.

Se utilizó una población comercial de *Orius laevigatus* (Syngenta®) para la realización de los ensayos. Para la cría se utilizaron botes de plástico de 1L, donde se dispusieron los individuos. Cada bote contenía: un vial con agua para proporcionar hidratación, una judía para la puesta de huevos, refugio y huevos de *Ephestia kuehniella* como alimento. Cada 48-72 horas se añadió alimento y extrajeron las judías con huevos de los botes. Estas judías se añadieron a un nuevo bote y así se realizó una nueva generación de cría.

### 2.2 Realización de los bioensayos.

La población comercial fue seleccionada desde la generación inicial ( $G_0$ ) a la octava generación ( $G_8$ ) con emamectina benzoato. Se aplicaron dosis de insecticida ascendentes según el avance de la selección de 15-200 mg L<sup>-1</sup>, a las que se añadieron secciones de judía de 3 cm, que una vez secas se expusieron a los individuos en botes de 1L con alimento y refugio. Se realizaron bioensayos de resistencia para la  $G_0$ ,  $G_6$  y  $G_8$ , para ello, se prepararon dosis de 1-300 mg L<sup>-1</sup> de emamectina a las que se añadieron igual que para las selecciones, secciones de judía de 3 cm, que se expusieron a los individuos en salseras que contenían alimento y refugio. Se realizaron 3 repeticiones por dosis y un control de 3 repeticiones con judía sin tratar. El tiempo de duración de las selecciones y los bioensayos fue de 7 días y transcurrido este periodo, se procedió a estimar la mortalidad.

### 2.3 Tratamiento de los datos.

En el caso de los bioensayos los datos obtenidos se analizaron con el programa POLO PLUS® usando un análisis Probit. Se calcularon las concentraciones letales ( $CL_{50}$ ), los límites fiduciales (LF) al 95% de confianza y la pendiente.

Para la estimación de la heredabilidad se utilizó el método de Tabashnik [6]  $h^2=R/S$ , donde  $R$  es la respuesta a la selección y  $S$  es la selección diferencial. De esta manera,  $R = [\log (CL_{50} \text{ final}) - \log (CL_{50} \text{ inicial})]/n$ , donde  $CL_{50}$  final es la  $CL_{50}$  de la descendencia,  $CL_{50}$  inicial corresponde a la  $CL_{50}$  de la generación parental y  $n$  es el número de generaciones seleccionadas. La selección diferencial ( $S$ ) se calculó como  $S = i \cdot \sigma_p$ , donde  $i$  es la intensidad de selección calculada como  $i = 1,583 - 0,0193336p + 0,0000428p^2 + 3,65194/p$ , dentro de la cual,  $p$  es el promedio de la tasa de supervivencia en la selección. La desviación estándar fenotípica se calculó como  $\sigma_p = [1/2 (\text{pendiente inicial} + \text{pendiente final})]^{-1}$  es decir, la pendiente de la línea de regresión del probit de los parentales más la pendiente de la descendencia después de  $n$  generaciones de selección.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El valor de la  $CL_{50}$  en los bioensayos de resistencia sufrió un incremento de 5,43 (1,98-9,92)  $mg L^{-1}$  en la  $G_0$  a 21,00 (13,98-28,82)  $mg L^{-1}$  en la  $G_6$ , existiendo diferencias significativas entre ambas. El valor en la  $G_8$  de la  $CL_{50}$  fue de 42,98 (15,55-73,77)  $mg L^{-1}$ , existiendo diferencias significativas con la  $G_0$  y no así con la  $G_6$ . Los valores de la pendiente fueron de 1,05, 2,75 y 1,64, para la  $G_0$ ,  $G_6$  y  $G_8$  respectivamente (Tabla 1). Los resultados obtenidos podemos compararlos con un ensayo de emamectina realizado con *Chrysoperla carnea* [7]. En este ensayo, la  $CL_{50}$  sufrió un incremento de 58,33  $mg L^{-1}$  a 1469,37  $mg L^{-1}$  después de 5 generaciones de selección. También se han hecho ensayos con emamectina para estudiar la resistencia de plagas como *Spodoptera exigua* [8], en el que la  $CL_{50}$  aumentó de 0,22  $mg L^{-1}$  a 0,526  $mg L^{-1}$  y *Phenacoccus solenopsis* [9] con un aumento de la  $CL_{50}$  de 3,75  $mg L^{-1}$  a 597,16  $mg L^{-1}$ , ambos ensayos durante 6 generaciones. Observando estos resultados, podemos decir que todos estos insectos ofrecieron una mayor resistencia a emamectina conforme aumentaron las generaciones de selección, al igual que ocurre con *O. laevigatus*.

El valor de la heredabilidad ( $h^2$ ) entre la generación parental y la generación 6 ( $G_0$ - $G_6$ ) fue de 0,16 y de 0,07 entre la generación 6 y la generación 8 ( $G_6$ - $G_8$ ) (Tabla 2). La variación fenotípica está compuesta por la variación genética ( $V_G$ ) y la variación medioambiental ( $V_E$ ). Bajo condiciones de laboratorio, una alta variación fenotípica puede venir de la presión de selección y mutación genética [10]. Según Falconer [11],  $h^2$  es la proporción de la varianza fenotípica debida a la variación genética aditiva. Los valores de  $h^2$  están comprendidos entre 0-1. Por lo tanto, bajos valores de  $h^2$  reflejan alta variación ambiental y baja variación genética aditiva. Si comparamos la evolución de  $h^2$  entre  $G_0$ - $G_6$  y  $G_6$ - $G_8$  observamos que  $h^2$  disminuye de 0,16 a 0,07, respectivamente. Esto es debido a que la respuesta a la selección no continúa indefinidamente, tarde o temprano se espera que todos los alelos favorables que se segregaban originalmente sean conducidos a la fijación y conforme se aproximen a ella, la varianza genética deberá declinar y la tasa de respuesta debe disminuir, hasta que la respuesta cese cuando la fijación sea total. La baja  $h^2$  (0,07) para *O. laevigatus* después de 8 generaciones de selección con emamectina demuestra que puede tener una menor probabilidad de desarrollo de resistencia a este insecticida. En el caso de *Chrysoperla carnea* [7], el valor de  $h^2$  para la resistencia a emamectina fue de 0,34, lo cual nos da a entender que existen mayores posibilidades del desarrollo de la resistencia.

### 4. CONCLUSIONES

Como conclusión se puede decir que aunque se observó un incremento en la resistencia a emamectina para *O. laevigatus* después de 8 generaciones de selección, los valores de la heredabilidad que se obtuvieron fueron bajos comparado con otros insectos. Estos resultados nos dan a entender que existen menos posibilidades para poder desarrollar una resistencia, ya que la respuesta a la selección es baja.

### 5. AGRADECIMIENTOS

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

### 6. REFERENCIAS

- [1] Angeli G., Baldessari M., Maines R., Duso C. 2005. Side-effects of pesticides on predatory bug *Orius laevigatus* (Heteroptera: Anthocoridae) in the laboratory. *Biocontrol Sci. Technol.* 15:745-754.
- [2] Delbeke F., Verduyck P., Tirry L., De Clerco P., Degheele D. 1997. Toxicity of diflubenzuron, pyriproxyfen, imidacloprid and diafenthiuron to the predatory bug *Orius laevigatus* (Heteroptera: Anthocoridae). *Entomophaga*. 42(3): 349-358.

- [3] Van de Veire M., Tirry L. 2003. Side effects of pesticides on four species of beneficials used in IPM in glasshouse vegetable crops: “worst case” laboratory tests. *Pesticides and Beneficial Organisms IOBC/wprs*. 26(5): 41-50.
- [4] Roush R. T., Croft B. 1986. Experimental population genetics and ecological studies of pesticides resistance in insects and mites, in: *Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management*, National Academy Press. Washington DC. Pp 257-270.
- [5] Bielza P., Quinto V., Fernández E., Grávalos C., Abellán J., Cifuentes D. 2008. Inheritance of resistance to acrinathrin in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Pest Manage. Sci.* 64: 584-588.
- [6] Tabashnik B.E., Mcgaughey W.H. 1994. Resistance risk assessment for single and multiple insecticides: responses of Indian meal moth (Lepidoptera: Pyralidae) to *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ.Entomol.* 87:834-841.
- [7] Mansoor M., Abbas Shad A.S., Pathan A.K., Razaq M. 2013. Increased fitness and realized heritability in emamectin benzoate resistant *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Ecotoxicology*. 22:1232-1240.
- [8] Ishtiaq M., Razaq M., Saleem M. A., Anjum F., Ane M.N., Raza A.M., Wright D.J. 2014. Stability, cross-resistance and fitness costs of resistance to emamectin benzoate in a re-selected field population of the beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctunidae). *Crop Protection*. 65:227-231.
- [9] Afzal M.B., Shad S.A. 2016. Characterization of *Phenacoccus solenopsis* (Homoptera: Pseudococcidae) resistance to Emamectin Benzoate: Cross-Resistance Patterns and Fitness Cost Analysis. *Pest Management*. 45:310-319.
- [10] Yang Y.H. 2000. *Basic Genetics*, Higher Education Press, Beijing, China. Pp 264-299.
- [11] Falconer D.S. 1989. *An Introduction to Quantitative Genetics*, Wiley, London, United Kingdom.

**Tabla 1.** Estimación de la toxicidad de emamectina para diferentes generaciones de *O. laevigatus*.

Población	Generaciones <sup>a</sup>	CL <sub>50</sub> (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	LF (95%) <sup>c</sup>	Pendiente <sup>d</sup>	% Supervivencia <sup>e</sup>
Syngenta	G <sub>0</sub>	5,43	1,98-9,92	1,05	-
	G <sub>6</sub>	21,00	13,98-28,82	2,75	28,47
	G <sub>8</sub>	42,98	15,55-73,77	1,64	15,22

(<sup>a</sup>) Generaciones con las que se realizaron bioensayos de resistencia; (<sup>b</sup>) concentración letal 50; (<sup>c</sup>) límites fiduciales (P<0,05); (<sup>d</sup>) pendiente hallada con probit; (<sup>e</sup>) porcentaje de supervivencia en la selección.

**Tabla 2.** Estimación de la heredabilidad para la resistencia a emamectina en *O. laevigatus*.

Generaciones <sup>a</sup>	R <sup>b</sup>	S <sup>c</sup>	I <sup>d</sup>	σ <sub>p</sub> <sup>e</sup>	h <sup>2f</sup>
G <sub>0</sub> -G <sub>6</sub>	0,53	0,10	0,63	1,20	0,16
G <sub>6</sub> -G <sub>8</sub>	0,46	0,05	0,70	1,54	0,07

(<sup>a</sup>) Generaciones entre las que se realizó la heredabilidad; (<sup>b</sup>) respuesta a la selección; (<sup>c</sup>) selección diferencial; (<sup>d</sup>) intensidad de selección; (<sup>e</sup>) desviación fenotípica; (<sup>f</sup>) heredabilidad.

## Heritability and response to selection for non-prey feeding tolerance in *Orius laevigatus* (Fieber)

## Heredabilidad y respuesta a la selección de la tolerancia a la alimentación sin presa en *Orius laevigatus* (Fieber)

J. E. Mendoza<sup>1\*</sup>, V. Balanza<sup>1</sup>, P. Bielza<sup>1</sup>

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

\*enrique.menriv@gmail.com

### Abstract

Narrow-sense heritability ( $h^2$ ) for non-prey feeding tolerance was estimated in an *Orius laevigatus* commercial population through the total fecundity during ten days when females are fed on pollen. In other hand, first steps of selection response was studied in three genetic lines as a result of different wild and commercial populations mix.  $h^2$  for this trait was 0.19 which applied to the initial genetic variances of these lines give a response selection between 7.3 and 7.6 eggs/female. This expected response is similar to those obtained for the first selection steps in the three lines. Although a half sib/full-sib breeding design is needed to predict the additive-genetic variation, these results are positive with regard to the potential breeding of this insect.

**Keywords:** total fecundity; insect breeding; selective pressure; pollen.

### Resumen

Se estimó la heredabilidad en sentido estricto ( $h^2$ ) de la tolerancia a la alimentación sin presa en una población comercial de *Orius laevigatus* a partir de la fecundidad total de sus hembras durante diez días alimentadas con polen. Además, se estudió la respuesta a los primeros pasos de selección en tres líneas previamente constituidas a partir de la mezcla de poblaciones silvestres y comerciales. La  $h^2$  de este carácter fue de 0.19, la cual, aplicada a la variabilidad genética de las tres líneas, predijo una respuesta a la selección de 7.3-7.6 huevos por hembra. Estos valores son similares a los obtenidos en los primeros pasos de selección de las tres líneas. Si bien es necesario un diseño de cruzamiento de medios hermanos/hermanos completos para predecir la varianza genética aditiva, estos resultados arrojan esperanzas para la obtención de una raza mejorada.

**Palabras clave:** fecundidad total; mejora genética; presión de selección; polen.

### 1. INTRODUCCIÓN

La tolerancia a la alimentación sin presa es un carácter que hace de un enemigo natural el candidato ideal para ser usado en programas de suelta inoculativa, ya que mostrará un mejor establecimiento en el cultivo a largo plazo, controlando a su presa cuando la densidad de ésta aún es baja [1]. Uno de los agentes de control biológico más usados en la actualidad es *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae), un depredador generalista común en la cuenca Mediterránea y el norte de Europa [2]. Se trata del principal enemigo del trips de las flores, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae), sobre el cual realiza un control preventivo

eficaz gracias a su capacidad para alimentarse del polen de las flores del cultivo [3]. Sin embargo, y a pesar de tratarse de una gran estrategia adaptativa, también es cierto que, si se alimentan exclusivamente de este modo, su fecundidad se reduce de forma considerable [4].

Por eso, mejorar su fecundidad en estas condiciones permitiría su liberación en el cultivo cuando la plaga aún no se hubiera extendido. En esa línea de trabajo, nuestro grupo viene estudiando la variabilidad de la tolerancia de las poblaciones mediterráneas de *O. laevigatus* a la alimentación con polen. Para ello, evaluamos la fecundidad de sus hembras en comparación con un tratamiento control, alimentado con huevos de *Ephestia* [5]. La varianza genética de un carácter influye de forma directa en el valor de los parámetros genéticos que rigen su evolución y su susceptibilidad a la selección [6]. Así, las investigaciones que se recogen en este trabajo tienen como objetivo aprovechar la variabilidad existente para iniciar un proceso de selección y mejora que nos permita obtener líneas con una mayor tolerancia al polen. Previamente se ha evaluado la heredabilidad realizada ( $h^2$ ) de la fecundidad en estas condiciones, un indicador de la evolución de un carácter a lo largo de un proceso de selección muy útil para predecir su respuesta a la selección, dándonos una idea de nuestras posibilidades de éxito en la mejora [10].

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Poblaciones de *Orius laevigatus*.

Para estudiar la heredabilidad se parte de una población comercial de *Orius laevigatus* suministrada por Koppert®. Para el proceso de selección se parte de tres líneas base (S0) que resultan de sendas mezclas de poblaciones silvestres y comerciales de las que se eligen las hembras que, en bioensayos previos en los que eran alimentadas con polen, hayan registrado una mayor fecundidad durante 10 días. Las poblaciones silvestres se recolectaron en distintas localidades de España, Italia y Grecia. El mantenimiento de las líneas base y los sucesivos pasos de selección se llevaron a cabo mediante la metodología de cría descrita por Mendoza et al. [5].

### 2.2 Métodos de bioensayo.

Para realizar todos los bioensayos se sigue la metodología descrita por Mendoza et al. [5]. Para estudiar la heredabilidad se parte de adultos recién emergidos de Koppert® alimentados con polen durante 3-5 días para que tenga lugar la cópula. Los supervivientes son sexados, individualizando a las hembras para estudiar su fecundidad durante 10 días mientras son alimentadas con polen. Se selecciona y se mezcla la descendencia de las hembras con un rendimiento más alto para evaluar la tolerancia al polen de las hijas que alcanzan al estado adulto. Para la selección, se evalúa la fecundidad de cada línea base S0, alimentándolas con polen y seleccionando a las hembras con un rendimiento más alto en estas condiciones para fundar sendas líneas S1. Este proceso se repite para los pasos de selección subsiguientes, hasta obtener una S3 en la Línea Base I, la más avanzada, y una S2 en las Líneas Base II y III.

### 2.3 Tratamiento estadístico.

Los bioensayos se realizan al azar, descartando las hembras que no ponen huevos durante al menos 7 de los 10 días. Se comparan las medias de fecundidad total ( $FT_{10}$ ) entre madres e hijas de Koppert® mediante un test de Student, así como entre pasos de selección sucesivos de las líneas base mediante ANOVA, comparando las medias por pares mediante la T2 de Tamhane.

### 2.4 Estimación de los parámetros genéticos.

Para obtener la  $h^2$  de la tolerancia al polen se calculan el diferencial de selección ( $S$ ) y la respuesta a la selección ( $R$ ) de este carácter a partir de las medias de fecundidad total durante 10 primeros ( $FT_{10-P}$  para las madres y  $FT_{10-F1}$  para las hijas) y la desviación típica ( $\sigma_P$ ) obtenidas en las dos generaciones de Koppert® mediante las siguientes ecuaciones [7]:

$$h^2 = R/S \quad (2.4.1) \quad S = i \cdot \sigma_p \quad (2.4.3)$$

$$R = FT_{10-F1}/FT_{10-P} \quad (2.4.2) \quad i = (1/p) \cdot [1/\sqrt{(2\pi)}] \cdot \exp(-t^2/2) \quad (2.4.4)$$

, donde  $i$  es intensidad de selección,  $p$  es la presión de selección (la proporción de hembras seleccionadas), y  $t$  el umbral de selección, obtenido a partir de la distribución normal tipificada.

Una vez establecidos los primeros pasos de selección de las tres líneas base, calculamos la respuesta a la selección entre los distintos pasos mediante la ecuación 2.4.2 y la comparamos con la respuesta esperada, que se calcula aplicando la heredabilidad obtenida y la intensidad de selección ejercida en el ensayo de Koppert® a la variabilidad genética de cada una de las líneas.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Heredabilidad de la tolerancia a la alimentación sin presa.

En la tabla 1 vemos que la  $FT_{10}$  de la segunda generación de Koppert es significativamente más alta que en la primera (p-valor=0.049), con un valor para la  $h^2$  de la tolerancia al polen de 0,19 y por tanto relativamente bajo, lo que concuerda con lo que suele obtenerse para caracteres relacionados con el ciclo vital en insectos, como la fecundidad. Sin embargo, caracteres relacionados con la morfología, la fisiología o el comportamiento presentan una  $h^2$  más alta [8].

#### 3.2 Respuesta a la selección.

En la tabla 2 vemos que en las 3 líneas se ha obtenido una respuesta a la selección positiva. A pesar de que entre los dos primeros pasos de la Línea Base I,  $R$  es negativa debido a un descenso en la  $FT_{10}$ , la media obtenida fue similar en las tres líneas, con valores por encima de los 6 huevos por hembra. Estos valores apenas difieren de la  $R$  esperada en función de la  $h^2$  obtenida, a pesar de que la intensidad de selección fue más baja en las líneas base. Esto puede deberse a que, mientras que en el ensayo inicial hay una relación directa entre las generaciones, en la selección se pueden dar varias generaciones entre pasos de selección sucesivos, por lo que es probable que se den mecanismos de selección que no se están teniendo en cuenta pero que contribuyan a la ganancia genética. Aún así, aumentar la intensidad de selección parece mejorar la  $R$ , aunque deben considerarse dos factores limitantes, tamaño de la población y endogamia, que establecen un límite en el número de hembras que se usarán como progenitoras [9]. También puede aumentar la  $R$  incrementando la  $h^2$ , aunque éste que no es un factor constante, sino que depende de las condiciones en las que se realiza la selección. No obstante, como argumentó Houle [10], la  $h^2$  es un indicador engañoso de la evolución de un carácter a lo largo de la selección, ya que una baja  $h^2$  puede reflejar una baja variación aditiva, una alta variación residual o ambas, sobre todo para caracteres relacionados con la valencia ecológica, con una elevada variabilidad (Tabla 2). Conviene calcular la componente aditiva de esta variabilidad ( $CV_A$ ) mediante un diseño de cruzamiento de medios hermanos y hermanos completos.

### 4. CONCLUSIONES

La tolerancia al polen en *Orius laevigatus* muestra una  $h^2$  relativamente baja, acorde con lo que se suele obtener en caracteres relacionados con el ciclo vital, así como una respuesta a la selección positiva en todas las líneas desarrolladas. No obstante, es posible optimizar el proceso de selección aumentando la intensidad. En cualquier caso, es necesario realizar un estudio más exhaustivo que nos permita obtener la variabilidad genética aditiva de este carácter para optimizar la mejora y obtener una línea genética con una alta eficacia en condiciones de escasez.

### 5. AGRADECIMIENTOS



Agradecer al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por la concesión de un contrato FPU, así como a E. Martínez-Díaz y M. Inglés por su inestimable ayuda técnica.

## 6. REFERENCIAS

- [1] Symondson W.O.C., Sunderland K.D., Greenstone M.H. 2002. Can generalist predators be effective biocontrol agents? *Annu. Rev. Entomol.* 47: 561-594.
- [2] Péricart J. 1972. Hémiptères. Anthocoridae, Cimicidae et Microphysidae de l'Ouest- Paléartique. Masson et Cie. Paris. Pp. 402.
- [3] Bonte M., De Clercq P. 2010. Influence of diet on the predation rate of *Orius laevigatus* on *Frankliniella occidentalis*. *BioControl.* 55: 625-629.
- [4] Wong S.K., Frank S.D. 2013. Pollen increases fitness and abundance of *Orius insidiosus* (Say) (Heteroptera: Anthocoridae) on banker plants. *Biological Control.* 64: 45-50.
- [5] Mendoza J.E., Balanza V., Sánchez-Martínez M.J., Bielza P. 2014. Variabilidad de la tolerancia a la alimentación sin presa en distintas poblaciones mediterráneas de *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae). Universidad Politécnica de Cartagena. Servicio de documentación. ISBN: 978-84-697-1358-7, 155-158.
- [6] Sorensen D.A., Kennedy B.W. 1984. Estimation of genetic variances from unselected and selected populations, *J. Anim. Sci.* 59: 1213-1223.
- [7] Falconer D.S., MacKay T.F.C. 1996. Introduction to quantitative genetics. 1996. 4<sup>a</sup> ed., Longman Group Ltd, UK.
- [8] Mousseau T.A., Roff D.A. 1987. Natural selection and heritability of fitness components. *Heredity.* 59: 181-197.
- [9] Bruns E. y Harvey W.R. 1976. Effects of varying selection intensity for two traits on estimation of realized genetic parameters. *J. Anim. Sci.* 42: 291-298.
- [10] Houle D. 1992. Comparing evolvability and variability of quantitative traits. *Genetics.* 130: 195-204.

**Tabla 1.** Heredabilidad realizada ( $h^2$ ) para la tolerancia al polen en *Orius laevigatus*.

Generaciones	N <sup>a</sup>	FT <sub>10</sub> <sup>b</sup> (huevos/hembra)	p <sup>c</sup>	
P	19	32,0 ± 14,7 a	0,16	
F1	6	43,7 ± 10,6 b	-	
Heredabilidad	h <sup>2</sup>	R <sup>d</sup>	S <sup>e</sup>	i <sup>f</sup>
P → F1	0,19	11,7	61,6	4,2

(<sup>a</sup>) N<sup>o</sup> de hembras ensayadas; (<sup>b</sup>) Fecundidad Total en los primeros diez días (las medias±SD seguidas por la misma letra no son significativamente distintas,  $p>0.05$ , T de Student); (<sup>c</sup>) Presión de selección; (<sup>d</sup>) Respuesta a la selección; (<sup>e</sup>) Diferencial de selección tipificado; (<sup>f</sup>) Intensidad de selección.

**Tabla 2.** Respuesta a la selección en las tres líneas base estudiadas de *Orius laevigatus*.

LÍNEA BASE <sup>a</sup>	N	FT <sub>10</sub> <sup>b</sup> (huevos/hembra)	i	R <sub>esp</sub> <sup>c</sup>	R	R <sub>obt</sub> <sup>d</sup>
I				7,3		6,1 ± 5,4 a
S0	400	21,0 ± 9,2 a	0,9		9,3	
S1	200	30,3 ± 13,9 b	0,8		-1,4	
S2	200	28,9 ± 7,8 b	2,5		10,5	
S3	176	39,4 ± 11,6 c	-		-	
II				7,3		7,8 ± 1,8 a
S0	350	20,4 ± 9,2 a	0,9		6,0	
S1	200	26,4 ± 10,7 b	0,9		9,6	
S2	200	36,0 ± 10,6 c	-		-	
III				7,6		7,7 ± 2,3 a
S0	400	20,9 ± 9,6 a	0,8		9,9	
S1	200	30,8 ± 12,2 b	0,8		5,4	
S2	17	36,2 ± 17,9 c	-		-	

(<sup>a</sup>) Grupos de poblaciones bioensayadas y primeros pasos de selección evaluados (S0-S3); (<sup>b</sup>) Fecundidad Total durante diez días (las medias±SD seguidas por la misma letra no son significativamente distintas,  $p>0.05$ , T2 de Tamhane); (<sup>c</sup>) Respuesta a la selección esperada en función de  $h^2$ ; (<sup>d</sup>) Respuesta media a la selección obtenida (las medias±SD seguidas por la misma letra no son significativamente distintas,  $p>0.05$ , T2 de Tamhane).

## Assessment of plant water indicators for regulated deficit irrigation management in sweet cherry

## Evaluación de indicadores de estrés hídrico en planta para el manejo del riego deficitario controlado en cerezo

V. Blanco<sup>1\*</sup>, P.J. Blaya-Ros<sup>1</sup>, A. Pérez-Pastor<sup>1</sup>, R. Domingo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. de Producción Vegetal. ETSIA-UPCT, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena. España.

\*victor.blanco@upct.es

### Abstract

A two-year experiment with sweet cherry (*P. avium* L. cv “Prime Giant”) trees under regulated deficit irrigation conditions was carried out to ascertain which of the following commonly used plant water indicators is most effective for irrigation scheduling: discrete measures of  $\Psi_t$  (midday stem water potential) and  $g_s$  (stomatal conductance) or continuous measurements of the branch diameter fluctuations, MCD (maximum daily branch shrinkage). MCD first identified irrigation changes and showed high signal intensity. Moreover, a threshold of -1.3 MPa is proposed in cherry trees irrigation management according to MCD.

**Keywords:** Maximum Daily Shrinkage; Midday Stem Water Potential; *Prunus avium* (L.); Stomatal Conductance

### Resumen

Un experimento de dos años en cerezo (*P. avium* L. cv “Prime Giant”) sometido a riego deficitario fue realizado para determinar cuál de los indicadores hídricos comúnmente utilizados es más efectivo en la programación del riego: las medidas discretas de  $\Psi_t$  (potencial hídrico de tallo a mediodía) y  $g_s$  (conductancia estomática) o las medidas continuas de las fluctuaciones del diámetro de rama, MCD (máxima contracción diaria de rama). MCD fue el indicador que primero detectó los cambios en el riego y mostró una alta intensidad de señal. Además, se propone el umbral de -1,3 MPa como límite para el manejo del cerezo de acuerdo con la MCD.

**Palabras clave:** Conductancia Estomática; Máxima Contracción Diaria; Potencial Hídrico de Tallo a Mediodía; *Prunus avium* (L.)

## 1. INTRODUCCIÓN

El cerezo es un cultivo prometedor por sus buenos precios de mercado, por ser una alternativa interesante y poderse simultanear con otros frutales de la explotación; y además, por tener variedades extra-tempranas y tempranas con necesidades hídricas inferiores a las de otras especies del mismo género. Estas características hacen del cerezo un cultivo atractivo para zonas con infradotación hídrica. El riego deficitario controlado (RDC) es una alternativa muy interesante para maximizar la eficiencia del uso del agua, si bien su aplicación requiere de una correcta programación. Los sensores en suelo y planta son fundamentales para el manejo del riego en RDC. Diversos trabajos en frutales y vid [1] han demostrado que RDC es capaz de incrementar la productividad del agua sin penalizar el rendimiento ni la calidad de los frutos.

Con el objetivo de aplicar correctamente RDC es necesario disponer de indicadores del estrés hídrico sensibles y de rápida detección. De ahí el interés de realizar un estudio comparativo que permita conocer sus ventajas y limitaciones en el seguimiento del comportamiento hídrico y para la programación del riego del cerezo.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la respuesta fisiológica del cerezo bajo dos regímenes hídricos: un tratamiento control (CTL) y otro de RDC, e identificar el indicador de planta más útil para la programación de riegos entre los comúnmente utilizados.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se llevó a cabo durante dos años consecutivos, 2015 y 2016, en una parcela experimental de 0,5 ha perteneciente a la finca comercial “Finca Toli”, localizada en Jumilla, Murcia (38° 8' N; 1° 22' W y 680 m de altitud). La plantación de cerezos (*Prunus avium* (L)) de 15 años de edad, variedad “Prime Giant” sobre SL 64, está dispuesta a marco de 5 m x 3 m y cuenta con polinizadores cv. “Brooks” y “Early Lory”. El sistema de riego por goteo constó de un único lateral por hilera de árboles y 3 goteros por árbol de 4 L h<sup>-1</sup>. El agua de riego es de pozo y de buena calidad (CE 0,8 dS m<sup>-1</sup>). El suelo es de textura franco-arenosa y medianamente pedregoso. Se aplicaron dos tratamientos de riego: i) control (CTL), regado al 110 % de la evapotranspiración potencial del cultivo (ET<sub>cg</sub>) con el objetivo de mantener condiciones no limitantes de agua en el suelo, y ii) riego deficitario controlado (RDC), programado al 100 % de ET<sub>cg</sub> durante precosecha y poscosecha inicial (diferenciación floral, Junio), y al 55 % de ET<sub>cg</sub> en la poscosecha restante (Julio - Noviembre). ET<sub>cg</sub> se determinó de acuerdo con la expresión propuesta por FAO:

$$ET_{cg} = ET_0 \times K_c \times K_r$$
 donde, ET<sub>0</sub> es la evapotranspiración de referencia, K<sub>c</sub> el coeficiente de cultivo [2] y K<sub>r</sub> un coeficiente corrector por localización [3].

El diseño experimental fue de bloques al azar con 4 repeticiones por tratamiento y 7 árboles por repetición, de los cuales se instrumentalizaron los 2 árboles centrales. El potencial hídrico de tallo a mediodía ( $\Psi_t$ ) se midió semanalmente en dos árboles por repetición, en hojas cercanas a la base del tronco y envueltas con plástico y papel de aluminio durante dos horas, utilizando cámara de presión (Soil Moisture Equipment Corp., Model 3005, Santa Barbara, CA, USA). En idénticos días y a la misma hora se midió la conductancia estomática (g<sub>s</sub>) en cuatro hojas adultas expuestas al sol por repetición, utilizando un equipo de intercambio gaseoso CIRAS-2 (PP Systems, Hitchin, Hertfordshire, UK). En cada repetición se instalaron 2 dendrómetros (LVDT, DF ± 2,5 mm, precisión 10 μm, Solatron Metrology, Bognor Regis, UK) en ramas principales de los árboles centrales. La máxima contracción diaria (MCD) se calculó como la diferencia entre el máximo y mínimo diámetro diario. Las contracciones de rama fueron registradas de manera continua a partir de una plataforma cableada dos repeticiones (datalogger más dos multiplexores - Campbell Scientific, Logan, USA) y las otras dos mediante una red de sensores inalámbrica (WSN, Widhoc SS, Fuente Álamo, España). Los datos meteorológicos fueron proporcionados por la red SIAR-Castilla-La Mancha (Ontur). El análisis de datos se realizó mediante ANOVA y regresiones lineales, el análisis de sensibilidad se calculó a partir del ratio entre la intensidad de señal (RDC/CTL) y el coeficiente de variación [4].

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las condiciones meteorológicas fueron similares en ambos años de estudio y típicas del clima mediterráneo con veranos secos y calurosos e inviernos suaves y húmedos. El DPV alcanzó valores máximos de 3,7 – 4,0 kPa y la ET<sub>0</sub> y lluvia acumuladas fueron de 1272 y 1220 y de 263 y 280 mm en 2015 y 2016, respectivamente.

$\Psi_t$  presentó un comportamiento similar en las dos campañas (Fig. 1), con los valores máximos al principio y final de temporada, cuando la demanda evaporativa es menor. CTL y RDC mostraron un comportamiento similar durante las precosechas de 2015 y 2016, sin diferencias significativas. Sin embargo, tras la aplicación del déficit hídrico en RDC, las diferencias aparecieron, con valores máximos ( $CTL_{\Psi_t} - RDC_{\Psi_t}$ ) de 0,53 y 0,56 MPa en 2015 y 2016, diferencias muy similares a las encontradas en cerezo variedad “Summit” [5]. Igual conducta a la observada en  $\Psi_t$  se encontró en  $g_s$ . Así, en precosecha, ambos tratamientos presentaron valores medios similares de  $g_s$ : 176 y 193 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> en 2015 y 182 y 176 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> en 2016 para CTL y RDC respectivamente. Contrariamente, en poscosecha, CTL mantuvo valores medios  $g_s$  superiores a los obtenidos en precosecha, 255 y 192 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, mientras que el tratamiento RDC disminuyó a 155 y 139 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> en 2015 y 2016, respectivamente. Igualmente, MCD repitió el patrón de  $\Psi_t$  y  $g_s$  y se vio claramente influida por los cambios de riego. No hubo diferencias de MCD entre tratamientos durante precosecha y sí durante poscosecha, los valores medios de cada tratamiento fueron 197 y 180  $\mu\text{m}$  para CTL y 289 y 244  $\mu\text{m}$  para RDC, en 2015 y 2016, respectivamente. Una diferencia apreciada en MCD respecto al resto de indicadores fue la rápida detección del cambio de riego. Así, 10 días después de la aplicación del déficit hídrico a RDC, sus contracciones medias superaban en un tercio a las del tratamiento CTL; siendo el indicador de planta que primero detectó el estrés hídrico. Este rápido comportamiento identificador de estrés hídrico de MCD ya fue descrito en ciruelo [6].

Las correlaciones obtenidas entre los diferentes indicadores en planta fueron altas, especialmente entre  $\Psi_t$  y MCD y  $\Psi_t$  y  $g_s$ .  $\Psi_t$  y MCD presentaron una alta correlación para todo el periodo de estudio [ $\Psi_t = -0.0019\text{MCD} - 0.3003$ ;  $R^2 = 0.83$ ]. Este valor pasa a 0,88 si solo consideramos el periodo final precosecha y principio del poscosecha, épocas de crecimiento del fruto y diferenciación floral, y que están caracterizadas por su alta sensibilidad al déficit hídrico. La correlación  $\Psi_t$  vs MCD presenta sus limitaciones para valores  $\Psi_t$  inferiores a -1,3 MPa, ya que subsiguientes disminuciones de potencial de tallo no se traducen en aumentos de MCD, de ahí la mejor correlación para el periodo indicado.  $\Psi_t$  vs  $g_s$  presentó una buena correlación durante el periodo del año más demandante (DDA 205-239 en 2015 y 203-232 en 2016;  $\Psi_t = 0.003g_s - 1.5598$ ;  $R^2 = 0.80$ ) momento en el que se producen los mínimos valores anuales de ambas variables.

En general, los resultados de los indicadores recogidos en la tabla 1 presentan una intensidad de señal (IS) alta y similar para el conjunto de ellos. No obstante, en la poscosecha de 2016,  $g_s$  es el indicador con mayor IS, tras él se sitúa MCD y en último lugar  $\Psi_t$ . Sin embargo, al analizar el coeficiente de variación (CV) de cada medida,  $\Psi_t$  es claramente el indicador con menor variación, más estable y robusto [7], lo que origina que  $\Psi_t$  sea también el indicador con una mayor sensibilidad, por encima de los otros dos indicadores. Comparando los indicadores, todos tienen una buena IS, pero para conseguir una mayor sensibilidad  $g_s$  y MCD deberían presentar un menor CV y para ello se recomienda un mayor número de medidas por repetición.

#### 4. CONCLUSIONES

En general, los indicadores recogidos en la tabla 1 presentan una intensidad de señal (IS) alta y similar para el conjunto de ellos. No obstante, en la poscosecha de 2016,  $g_s$  fue el indicador con mayor IS, seguido por MCD y en tercer lugar  $\Psi_t$ . Sin embargo, al analizar el coeficiente de variación (CV) fue  $\Psi_t$  el indicador más estable al presentar el menor CV [10], este bajo CV dio lugar a que  $\Psi_t$  fuese además el indicador más sensible. Aunque los 3 indicadores estudiados tienen una buena IS, tanto  $g_s$  como MCD requieren de un mayor número de medidas para tener idéntica representatividad que  $\Psi_t$ .

## 5. AGRADECIMIENTOS

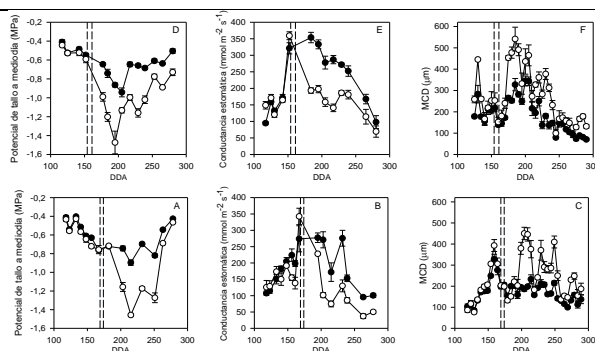
Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España y por fondos FEADER. Referencia: AGL2013-49047-C2-1-R. Víctor Blanco agradece la beca de iniciación a la actividad investigadora recibida de la UPCT. Los autores agradecen a Pedro y Agustín Carrión-Guardiola, propietarios de “Finca Toli” todas las facilidades puestas a nuestro alcance para el correcto desarrollo de los ensayos.

## 6. REFERENCIAS

- [1] Ruiz-Sanchez, Domingo, M.C., Castel, R., Revisión, J.R., 2010. Riego deficitario en frutales y vid en España (Review. Deficit irrigation in fruit trees and vines in Spain). Span. J. Agric. Res. 8, 5–20.
- [2] Marsal, J. FAO Irrigation and drainage paper 66. 2012. Crop yield response to water. Sweet cherry, 449-457 2012. FAO, Rome.
- [3] Fereres, E., Martinich, D.A., Aldrich, T.M., Castel, J.R., Holzapfel, E., Schulbach, H., 1982. Drip irrigation saves money in young almond orchards. Calif. Agric. 36, 12-13.
- [4] Fereres, E., Goldhamer, D.A., 2003. Suitability of stem diameter variations and water potential as indicators for irrigation scheduling of almond trees. J. Hortic. Sci. Biotech. 78, 139-144.
- [5] Marsal, J., López, G., del Campo, J., Mata, M., Arbones, A., Girona J., 2010. Postharvest regulated deficit irrigation in Summit sweet cherry: fruit yield and quality in the following season. Irrigation Sci. 28, 181-189.
- [6] Intrigliolo, D.S., Castel, J.R., 2004. Continuous measurement of plant and soil water status for irrigation scheduling in plum. Irrigation Sci. 23, 93-102.
- [7] Girona, J., Marsal, J., Lopez, G., 2006. Establishment of stem water potential thresholds for the response of ‘O’Henry’ peach fruit growth to water stress during stage III of fruit development. Acta Hortic. 713, 197-201.

**Tabla 1.** Análisis de sensibilidad de los indicadores de estrés hídrico en planta  $\Psi_t$ ,  $g_s$  y MCD para el tratamiento RDC durante el periodo poscosecha.

	$\Psi_t$		$g_s$		MCD	
	2015	2016	2015	2016	2015	2016
IS	1,52	1,46	1,63	2,09	1,62	1,52
CV	0,09	0,06	0,20	0,21	0,28	0,16
S	17,32	23,22	8,04	10,06	5,75	9,47



**Figura 1.** Evolución anual del potencial hídrico de tallo a mediodía, conductancia estomática y máxima contracción diaria de CTL y RDC.

A, B y C son datos de 2016 y D, E y F de 2015. Tratamiento CTL con símbolos negros y RDC con blancos. Las líneas verticales discontinuas indican las cosechas (DDA 154 y 161 en 2015 y DDA 169 y 174 en 2016).

# Selection of a *Tuta absoluta* population (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) resistant to chlorantraniliprole

## Selección de una población de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) resistente a clorantraniliprol

L. García-Vidal<sup>1\*</sup>, M.R. Martínez-Aguirre<sup>1</sup>, P. Bielza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena.  
\*lidiaGV\_ct@hotmail.com

### Abstract

The tomato borer, *Tuta absoluta*, is one of the most important pests in tomato crops in the world. Chlorantraniliprole is an insecticide belonging to the diamides group, widely used to manage *T. absoluta*, due to its compatibility with natural enemies and pollinators. Recently, cases of resistance development to this insecticide are appearing in some Italian and Brazilian *T. absoluta* populations. In this study, the results of the selection for chlorantraniliprole of a resistant population of *T. absoluta* are presented, with a LC<sub>50</sub> of 7,453 ppm. In addition, cross-resistance among the diamides chlorantraniliprole, cyantraniliprole and flubendiamide for the chlorantraniliprole resistant population was found.

**Keywords:** Tomato borer; diamides; cross-resistance; rynaxypyr.

### Resumen

La polilla del tomate, *Tuta absoluta*, es una de las plagas más importantes en el cultivo del tomate a nivel mundial. Clorantraniliprol es un insecticida perteneciente al grupo de las diamidas, ampliamente utilizado para el control de *T. absoluta*, debido a su compatibilidad con los enemigos naturales y polinizadores. Recientemente, están apareciendo casos de desarrollo de resistencia a este insecticida en poblaciones italianas y brasileñas de *T. absoluta*. En este estudio, se muestran los resultados obtenidos de la selección de una población resistente de *T. absoluta* a clorantraniliprol, con una CL<sub>50</sub> de 7.453 ppm. Además, se han encontrado resistencias cruzadas entre las diamidas clorantraniliprol, ciantraniliprol y flubendiamida para la población resistente a clorantraniliprol.

**Palabras clave:** Polilla del tomate; diamidas; resistencias cruzadas; rynaxypyr.

## 1. INTRODUCCIÓN

La polilla del tomate o gusano minador del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), es originaria de Sudamérica y fue detectada por vez primera en España en el año 2006 [1], desde donde se extendió, posteriormente, a otros países de Europa. En la actualidad, *T. absoluta* es considerada una de las plagas más importantes del cultivo del tomate [2]. El control químico es el principal método de control utilizado en *T. absoluta*, por lo que es importante estudiar la evolución de la resistencia de esta plaga a los insecticidas autorizados para su control, para poder desarrollar estrategias anti-resistencia y conocer los mecanismos de resistencia implicados.

El insecticida clorantraniliprol pertenece al grupo de las diamidas, un nuevo grupo de insecticidas clasificados como moduladores del receptor de la rianodina [3]. En la actualidad, clorantraniliprol es ampliamente utilizado para el control de diferentes plagas agrícolas, entre ellas *T. absoluta*. Sin embargo, en los últimos años han aparecido casos de desarrollo de resistencia a este insecticida en algunas especies de lepidópteros, como en *Spodoptera litura* [4] y también en poblaciones de *T. absoluta* tanto italianas [5], como brasileñas [6].

Los objetivos de este trabajo son obtener una población de *T. absoluta* resistente al insecticida clorantraniliprol; y una vez obtenida la población resistente, estudiar las resistencias cruzadas con las otras diamidas empleadas para el control químico de *T. absoluta*.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Población de *T. absoluta*

La población de *T. absoluta* empleada en este estudio se llama Sicilia, y fue recolectada en diciembre de 2014 en la región de Sicilia, Italia, en un invernadero de tomate. En el laboratorio, la población se mantiene en una jaula de cría con planta de tomate (*Solanum lycopersicum* L cv. Bobcat) para su alimentación, en condiciones controladas de temperatura ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), humedad relativa ( $60\pm 5\%$ ) y fotoperiodo (16/8 h luz/oscuridad).

### 2.2 Insecticida

El insecticida empleado en este trabajo fue clorantraniliprol, cuya formulación comercial es: Altacor 35WG (rynaxypyr) 35% p/p, de la empresa DuPont.

### 2.3 Bioensayos de susceptibilidad

Estos bioensayos se realizaron con larvas de segundo estadio (L2) de *T. absoluta*.

El método de inmersión de hojas de tomate fue empleado para la realización de los bioensayos [7]. Se utilizaron distintas concentraciones del insecticida y un control. Se cortaron hojas de tomate, se sumergieron en las distintas concentraciones y se pusieron a secar. Cada hoja se colocó en una caja transparente (dimensiones 12x10x5 cm) y las larvas L2 de *T. absoluta* se colocaron encima de las hojas. Los bioensayos se realizaron con 3 repeticiones por concentración y 10 larvas por repetición, con un total de 30 larvas por concentración de insecticida. La mortalidad se evaluó tras 72 horas.

### 2.4 Bioensayos de selección de resistencias

Para los bioensayos de selección se empleó también el método de inmersión de hojas de tomate. En este caso, se cortaron las hojas con las larvas L2 en su interior y se sumergieron en la concentración de insecticida empleada para la selección. La mortalidad se evaluó tras 96 horas.

### 2.5 Análisis de los datos

Se obtuvieron las curvas de dosis - mortalidad usando el programa estadístico POLO-Plus.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de la selección a clorantraniliprol de la población Sicilia. Se observa un aumento de la concentración del insecticida, hasta alcanzar la selección 7, en la que la mortalidad a 3000 ppm es de 22,9%. En la Tabla 2 se presentan los resultados de los bioensayos de susceptibilidad realizados al inicio de la selección y en la selección 8. Se puede observar un elevado aumento de la resistencia a clorantraniliprol en la selección 8, con una CL50 de 7453 ppm, siendo 156 veces superior a la CL50 de la S0 (47, ppm). Por lo tanto,

se considera que la selección S8 de Sicilia es una población resistente al insecticida clorantanaliprol, llamando a esta población resistente Sicilia S8.

En la Tabla 3 se presentan los resultados de los bioensayos de susceptibilidad de la población resistente a clorantanaliprol, Sicilia S8, a las diamidas ciantraniliprol y flubendiamida. Se observa que la CL50 de Sicilia S8 a ciantraniliprol es de 751,7 ppm, con un factor de resistencia de 109, con respecto a la CL50 (6,9 ppm) de la población Sicilia S0 bioensayada al inicio de la selección para el insecticida ciantraniliprol. También se observa que la CL50 de Sicilia S8 a flubendiamida es de 21216 ppm, con un factor de resistencia de 47,2 con respecto a la CL50 (449,8 ppm) de la población Sicilia S0 bioensayada al inicio de la selección para el insecticida flubendiamida. En base a estos resultados, se puede afirmar que existe resistencia cruzada entre el insecticida clorantanaliprol y ciantraniliprol, y entre clorantanaliprol y flubendiamida, para la población resistente a clorantanaliprol, Sicilia S8, obtenida en el laboratorio. Por otro lado, en un estudio de Roditakis *et al.* [8], se han encontrado dos mutaciones, presentes en una población italiana de *T. absoluta* resistente a clorantanaliprol, que parecen ser las responsables de la resistencia a diamidas en *T. absoluta*, y también de las resistencias cruzadas entre clorantanaliprol, ciantraniliprol y flubendiamida.

#### 4. CONCLUSIONES

En vista de los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir que se ha obtenido con éxito en el laboratorio una población de *T. absoluta* resistente a clorantanaliprol. Además, se han encontrado resistencias cruzadas entre los insecticidas clorantanaliprol, ciantraniliprol y flubendiamida en la población resistente a clorantanaliprol Sicilia S8.

#### 5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2011-25164) y los fondos europeos FEDER. También ha sido financiado parcialmente por DuPont e IRAC España. LGV agradece al MECD por la beca FPU (13/01528).

#### 6. REFERENCIAS

- [1] Urbaneja A., González-Cabrera J., Arnó J., Gabarra R. 2012. Prospects for the biological control of *Tuta absoluta* in tomatoes of the Mediterranean basin. *Pest Manag. Sci.* 68: 1215-1222.
- [2] Desneux N., Luna M.G., Guillemaud T., Urbaneja A. 2011. The invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production. *J. Pest Sci.* 84: 403-408.
- [3] IRAC MoA Classification Scheme (Version 8.1) 2016. <http://www.irc-online.org>.
- [4] Su, J., Lai, T., Li, J. 2012. Susceptibility of field populations of *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) in China to chlorantanaliprole and the activities of detoxification enzymes. *Crop. Prot.* 42: 217-222.
- [5] Roditakis, E., Vasakis, E., Grispu, M., Stavrakaki, M., Nauen, R., Gravouil, M., Bassi, A. 2015. First report of *Tuta absoluta* resistance to diamide insecticides. *J. Pest. Sci.* 88: 9-16.
- [6] Silva, J.E., Assis, C.P.O., Ribeiro, L.M.S., Siqueira, H.A.A. 2016. Field-Evolved Resistance and Cross-Resistance of Brazilian *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) Populations to Diamide Insecticides. *J. Econ. Entomol.* 1-6.
- [7] García-Vidal, L., Martínez-Aguirre, M.R., Bielza, P. 2014. Línea base de susceptibilidad y selección de poblaciones resistentes de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). En: *Actas del III Workshop en Investigación Agroalimentaria – WiA14*, eds. (TAIDA-UPCT, Cartagena, España), p.101.
- [8] Roditakis, E., Steinbach, D., Moritz, G., Vasakis, E., Stavrakaki, M., Ilias, A., García-Vidal, L., Martínez-Aguirre, M.R., Bielza, P., Morou, E., Silva, J.E., Silva, W.M., Siqueira, H.A.A., Iqbal, S., Troczka, B.J., Williamson, M.S., Bass, C., Tsagkarakou,



A., Vontas, J., Nauen, R. 2017. Ryanodine receptor point mutations confer diamide insecticide resistance in tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Insect Biochem. Molec.* 80: 11-20.

**Tabla 1.** Selección de resistencia a clorantraniliprol en la población Sicilia.

Selección	ppm	Total larvas	% Mortalidad
S0	100-300	2080	58,7
S1	250-300	962	31,6
S2	300-500	1598	81,1
S3	300	769	72,8
S4	300	1624	63,1
S5	300	1222	48,6
S6	3000	860	56,1
S7	3000	976	22,9

**Tabla 2.** Toxicidad a clorantraniliprol en las selecciones S0 y S8 de la población Sicilia.

Selección	CL50 (ppm)	LF (95%)	FR
S0	47,7	24,5-183,1	1
S8	7453	2705-26004	156

\* **CL50:** Concentración Letal 50 en ppm. **LF (95%):** Límites fiduciales calculados al 95%. **FR:** Factor de resistencia con respecto a la Línea Base de Susceptibilidad

**Tabla 3.** Toxicidad a ciantraniliprol y flubendiamida de la población resistente a clorantraniliprol Sicilia S8.

Insecticida	Población	CL50 (ppm)	LF (95%)	FR
Ciantraniliprol	Sicilia S0	6,9	2,3-13,6	1
	Sicilia S8	751,7	289,2-1347,2	109
Flubendiamida	Sicilia S0	449,8	115,3-875,2	1
	Sicilia S8	21216	6518-32350	47,2

\* **CL50:** Concentración Letal 50 en ppm. **LF (95%):** Límites fiduciales calculados al 95%  
**FR:** Factor de resistencia con respecto a la Línea Base de Susceptibilidad

## Resistance to neonicotinoids in Spanish populations of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae)

## Resistencia a neonicotinoides en poblaciones españolas de *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae)

A. Belando<sup>1\*</sup>, I. Moreno<sup>1</sup>, C. Grávalos<sup>1</sup>, P. Bielza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Producción Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203, Spain.

\*Ana\_belando@hotmail.com

### **Abstract**

The peach aphid, *Myzus persicae*, is a pest of global importance. This species has developed resistance to many chemical classes, including organophosphates, carbamates and pyrethroids. Neonicotinoids are not affected by these mechanisms, and are currently the primary means of control. In 2009, it was found on peach trees in southern France a clone of *Myzus persicae* extremely powerful resistance to neonicotinoids, compromising their effectiveness in the field, being the first example of resistance to neonicotinoid at the site of action found in field populations of any species. To study the presence of this mutation in Spain, twelve populations from different regions were collected. The LC<sub>50</sub> values for imidacloprid ranged from 2.84 ppm to 944.9 ppm showing a high variability, suggesting that the most resistant populations carry the mutation. The most imidacloprid resistant populations also showed thiamethoxam resistance.

**Keywords:** Plague; mechanisms; clone.

### **Resumen**

El pulgón del melocotonero, *Myzus persicae*, es una plaga de importancia mundial. Esta especie ha desarrollado resistencia múltiple a muchas clases químicas, incluyendo organofosforados, carbamatos y piretroides. Los neonicotinoides no se ven afectados por estos mecanismos, y son actualmente el principal medio de control. En 2009 se descubrió sobre melocotoneros en el sur de Francia un clon de *Myzus persicae* con resistencia extremadamente potente a los neonicotinoides, comprometiendo su eficacia en campo, siendo el primer ejemplo de resistencia a neonicotinoides en el punto de acción encontrada en poblaciones de campo de cualquier especie. Para estudiar la presencia de esta mutación en España se recolectaron doce poblaciones de diferentes regiones. Los valores obtenidos de LC<sub>50</sub> a imidacloprid variaron de 2,84 ppm a 944,9 ppm demostrando una alta variabilidad, sugiriendo que las poblaciones más resistentes portan la mutación. Las poblaciones más resistentes a imidacloprid también mostraron resistencia a tiametoxam.

**Palabras clave:** Plaga; mecanismos; clon.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Myzus persicae* es una plaga de importancia mundial de una amplia gama de cultivos, por sus daños directos y por su capacidad de transmitir virus de plantas [1]. El control de *M. persicae* se basa casi exclusivamente en la aplicación de insecticidas y, como resultado, esta especie ha

desarrollado resistencia múltiple a muchas clases químicas, incluyendo carbamatos, organofosforados y piretroides [2]. Los mecanismos moleculares de resistencia a los insecticidas en *M. persicae* incluyen la sobreproducción de carboxilesterasas (E4 o FE4) que confiere resistencia principalmente a organofosforados, y dos formas de resistencia en el punto de acción [2]. Una de ellas es una mutación de la proteína de la acetilcolinesterasa (acetilcolinesterasa modificada, MACE por sus siglas en inglés) dando insensibilidad a los dimetil-carbamatos (ej. pirimicarb) [2]. La otra es una mutación del canal de sodio dependiente del voltaje (resistencia knockdown, kdr) dando resistencia a los piretroides. Los neonicotinoides tales como imidacloprid, tiametoxam, tiacloprid, clotianidina y acetamiprid no se ven afectados por estos mecanismos, y actualmente son el principal medio de control.

Los neonicotinoides habían demostrado ser invulnerables al desarrollo de resistencias y se habían mantenido muy eficaces contra *M. persicae*, pero en 2009 se descubrió sobre melocotoneros en el sur de Francia un clon de *M. persicae* con resistencia extremadamente potente a los neonicotinoides, comprometiendo su eficacia en campo [3]. La resistencia es conferida tanto por la detoxificación mediada por P450s como por la insensibilidad del punto de acción de los neonicotinoides [3] Éste es el primer ejemplo de la resistencia a los neonicotinoides en el punto de acción encontrada en poblaciones de campo de cualquier especie [4,5]. La comparación de la secuencia de nucleótidos de seis genes de subunidades del nAChR (M $\alpha$ 1-5 y M $\beta$ 1) de clones de pulgones resistentes y susceptibles, reveló un único punto de mutación en la región D del bucle de la subunidad  $\beta$ 1 del nAChR del clon resistente, causando una sustitución de arginina a treonina (R81T) [3].

Debido a las graves consecuencias de esta mutación para el control efectivo de *M. persicae* el objetivo de este trabajo es realizar un seguimiento de su expansión geográfica y estudiar el desarrollo potencial de la resistencia a los neonicotinoides imidacloprid y tiametoxam. Hasta el momento se ha encontrado en Italia, Francia y España.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Poblaciones

Se recogieron 12 poblaciones de *M. persicae* de cultivos frutales de las principales zonas productoras (Lérida, Zaragoza y Murcia) abarcando diferentes escenarios de presión insecticida. Las poblaciones se criaron sobre plantas de pimiento en jaulas.

### 2.2 Insecticidas

Los neonicotinoides empleados en los bioensayos han sido imidacloprid y tiametoxam

### 2.3. Bioensayos

Para los ensayos completos se utilizaron 4-5 concentraciones y un control para cada insecticida y población, tres repeticiones por concentración, y 30 individuos por repetición. Las dosis para cada insecticida se tomaron para un rango de 0-100% de mortalidad.

En hojas de pimiento se realizaron discos (37mm diámetro) que fueron sumergidos durante 10 segundos en la solución acuosa del insecticida a ensayar. Los discos fueron secados al aire y puestos sobre agar (1%) con el envés hacia arriba en la base de cajas de polipropileno. Las cajas son tapadas con su tapa, que están acondicionadas para que puedan transpirar los pulgones y no se mueran por asfixia. Las placas son mantenidas a 25°C y fotoperiodo de 16:8 h (luz: oscuridad). La mortalidad se estimó a las 24, 48 y 72 horas para ajustar el mejor periodo para cada insecticida, la LC<sub>50</sub> se calculó mediante un programa estadístico (POLO PLUS). Se realizaron los bioensayos con adultos ápteros.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de LC<sub>50</sub> para imidacloprid variaron de 2,84 ppm a 944,9 ppm demostrando una alta variabilidad (Tabla 1). Las poblaciones JM03, CH01, AS01 y PL01 fueron susceptibles, BS, LLEIDA, JRP2, FLIX JML04 y JM01 medianamente resistentes y JML06 y JML02 resistentes a imidacloprid.

Se piensa que aquellas poblaciones que presentan una resistencia moderada deben de tener solamente el mecanismo de resistencia metabólico, mientras que las poblaciones resistentes presentan ambos mecanismos de resistencia: metabólico y en el punto de acción. Si este resultado lo comparamos con el de la bibliografía [6] donde el resultado obtenido es de 235 ppm vemos que nuestras poblaciones resistentes presentan valores similares o superiores, lo que sugiere la presencia de la mutación.

Las poblaciones más resistentes a imidacloprid (JML06 y JML02) también mostraron resistencia a tiametoxam (Tabla 2). Sin embargo, no hay un patrón claro de resistencia cruzada entre las poblaciones menos resistentes.

### 4. CONCLUSIONES

Se ha constatado la presencia en España de poblaciones de *M. persicae* altamente resistente a neonicotinoides.

### 5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está siendo financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2014-55298-R) y los fondos europeos FEDER. También ha sido financiado parcialmente por IRAC España.

### 6. REFERENCIAS

- [1] Blackman RL., Eastop VF., 2000. Aphids on the world's crops, an identification and information guide. Chichester. UK: John Wiley & Sons Ltd.
- [2]. Devonshire AL., Field LM., Foster SP., Moores GD., Williamson MS., Blackman RL. 1998. The evolution of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 353:1677-1684.
- [3] Bass C., Puinean A., M., Andrews M., Cutler P., Daniels M., Elias, J., & Slater R. 2011. Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor  $\beta$  subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. BMC neuroscience, 12(1), 51.
- [4]. Puinean A., M., Denholm I., Millar N. S., Nauen R., Williamson M. S. 2010. Characterisation of imidacloprid resistance mechanisms in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål (Hemiptera: Delphacidae). Pest. Biochem. Physiol 97:129-132.
- [5]. Wen Y., Liu Z., Bao H., Han Z. 2009. Imidacloprid resistance and its mechanisms in field populations of brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål in China. Pest. Biochem. Physiol 94:36-42.
- [6] Slater, R., Paul, V. L., Andrews, M., Garbay, M., & Camblin, P. 2012. Identifying the presence of neonicotinoid resistant peach-potato aphid (*Myzus persicae*) in the peach-growing regions of southern France and northern Spain. Pest. management science, 68(4), 634-638.

**Tabla 1.** LC<sub>50</sub> de poblaciones de *M. persicae* a imidacloprid.

POB	LC <sub>50</sub>	Límites(Inf-Sup)	FR
JM03	2.86	1.00-5.39	1.0
CH01	2.84	1.04-7.85	1.0
AS01	4.33	0.79-18.96	1.5
PL01	7.331	2.11-22.1	2.6
BS	37.81	14.94-174.69	13.2
LLEIDA	17.59	2.51-38.80	6.1
JRP2	40.15	12.03-100.1	14.0
FLIX	33.89	9.86-77.67	11.8
JM01	133.86	35.9-9059.41	47.13
JML04	45.19	3.54-116.9	15.8
JML06	944.9	412.9-7520	330
JML02	240.2	161.5-342.8	84.0

POB = Poblaciones

FR= Factor de Resistencia

**Tabla 2.** LC<sub>50</sub> de poblaciones de *M. persicae* a tiametoxam.

POB	LC <sub>50</sub>	Límites(Inf-Sup)	FR
JML04	0.19	0.02-0.53	0.05
AS01	1.79	0.82-3.52	0.5
JM03	3.92	1.52-12.32	1.0
JRP2	3.93	1.54-7.93	1.0
FLIX	4.92	0.51-11.19	1.3
LLEIDA	9.02	2.16-46.93	2.3
FLIX	4.92	0.51-11.19	1.3
JM01	12.51	3.26-43.16	65.8
CH01	48.16	21.09-173.6	12.3
PL01	56.3	10.8-129.14	296.26
BS	65.05	15.47-726.0	16.6
JML02	221.3	78.9-689.4	56.45
JML06	257.2	132.57-452.7	65.6

POB = Poblaciones

FR= Factor de Resistencia

## Evolution of *Bemisia tabaci* (Gennadius) resistance to cyantraniliprole in 2016 and 2017

## Evolución de la resistencia de *Bemisia tabaci* (Gennadius) a ciantraniliprol en 2016 y 2017

I. Moreno<sup>1\*</sup>, A. Belando<sup>1</sup>, C. Grávalos<sup>1</sup>, P. Bielza<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Producción Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena, Spain.

\*inma.moreno@upct.es

### Abstract

Cyantraniliprole is a novel anthranilic diamide insecticide and acts on a large number of pests exclusively activating their ryanodine receptors. It is very effective in the fight against whitefly and is considered to have a favorable ecotoxicological profile. In this work, it has been compared the evolution of the susceptibility of Mediterranean populations of *B. tabaci* to cyantraniliprole with previous studies. Our results showed the current situation of high susceptibility to this new diamide ( $CL_{50} = 0.022-0.095 \text{ mg L}^{-1}$ ), and being similar to the baseline susceptibility of *B. tabaci* to cyacypyr, established in 2015 ( $CL_{50} = 0.048 \text{ mg L}^{-1}$ ). As a conclusion, cyacypyr continues to show a high efficacy in the control of *B. tabaci*. Despite this it is a product that requires a high level of vigilance, because of the threat of the development of resistance.

**Keywords:** anthranilic diamide; ryanodine; cyacypyr.

### Resumen

Ciantraniliprol es un nuevo insecticida del grupo de las diamidas antranílicas, que actúa sobre un gran número de plagas activando exclusivamente sus receptores de rianodina. Es muy efectivo en la lucha contra mosca blanca y se considera que tiene un perfil ecotoxicológico favorable. En este trabajo se ha comparado la evolución de la susceptibilidad de poblaciones mediterráneas de *B. tabaci* a ciantraniliprol, con estudios previos. Nuestros resultados relevaban la situación actual de alta susceptibilidad a esta nueva diamida ( $CL_{50} = 0,022-0,095 \text{ mg L}^{-1}$ ), siendo los valores descritos similares a la línea base de susceptibilidad de *B. tabaci* frente a dicho producto, establecida en 2015 ( $CL_{50} = 0,048 \text{ mg L}^{-1}$ ). En conclusión, cyacypyr sigue mostrando una alta eficacia en el control de *B. tabaci*. A pesar de ello es un producto que requiere de un alto nivel de vigilancia, puesto que siempre está presente la amenaza del desarrollo de resistencias.

**Palabras clave:** diamidas antranílicas; rianodina; cyacypyr.

## 1. INTRODUCCIÓN

La mosca blanca *Bemisia tabaci* Gennadius, es una plaga polífaga, que ocasiona importantes daños tanto en frutales, como cultivos hortícolas y ornamentales a nivel mundial. Además de los daños provocados y la transmisión de virosis, hay que añadir su facilidad para desarrollar resistencia a diferentes productos insecticidas, hecho que en ocasiones imposibilita su control.

El uso de insecticidas ha sido la estrategia principal para el control de *B. tabaci*. Por tanto, como consecuencia de esta elevada presión insecticida, esta plaga ha desarrollado niveles de resistencia de moderados a extremadamente altos frente a la mayoría de grupos químicos, incluyendo hidrocarburos clorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, reguladores del crecimiento y neonicotinoides [1,2].

Con el fin de mantener bajo control las poblaciones de mosca blanca y dada la facilidad con que esta plaga desarrolla resistencias, se hace necesario el desarrollo de nuevos compuestos con diferentes modos de acción para ser incorporados en las estrategias de gestión de la resistencia a insecticidas (GRI). Para llevarlo a cabo de modo racional, antes de incorporar un nuevo insecticida hay que llevar a cabo multitud de ensayos, en primer lugar para conocer los niveles de resistencia de las poblaciones de partida, lo que se conoce como susceptibilidad basal, que debe ser tomada en cuenta como referencia para controlar la evolución potencial de la resistencia.

Ciantraniliprol es un nuevo insecticida del grupo de las diamidas antranílicas, con un nuevo modo de acción, que pertenece al grupo 28 de la clasificación que propone el Comité de Acción contra la Resistencia a Insecticidas (IRAC). Este grupo de insecticidas funciona como selector de los canales iónicos que modulan la liberación de calcio. Las moléculas de ciantraniliprol se unen a los receptores de rianodina, causando una liberación incontrolada de calcio y evitando una mayor contracción muscular [3,4]. Ensayos llevados a cabo tanto en campo como en laboratorio [5,6] han mostrado su alta eficacia frente a *Bemisia tabaci* y otras plagas. Según estudios realizados por Cameron et al. [7] este insecticida también actúa reduciendo la alimentación, lo que produce una disminución en la transmisión de virosis.

El objetivo de este trabajo es comparar la evolución de la susceptibilidad a ciantraniliprol en ninfas de poblaciones de campo de *B. tabaci* de la cuenca mediterránea, desde el inicio del uso en campo de esta nueva diamida, para poder establecer las medidas necesarias de control en el caso de desarrollo de resistencias.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Poblaciones de campo**

Se utilizaron doce poblaciones de campo de *B. tabaci* de la cuenca mediterránea, cinco poblaciones de España (ES), tres de Grecia (GRE), tres de Italia (ITA) y una de Israel (IS), recogidas entre los años 2015 y 2016.

### **2.2 Insecticida**

Todos los bioensayos se llevaron a cabo con ciantraniliprol (Cyazypyr 20SC; Verimark<sup>TM</sup>, DuPont Crop Protection, Newark, DE).

### **2.3 Bioensayo sistémico de ninfas**

Para estudiar el estado actual de la resistencia a ciantraniliprol en diferentes poblaciones de *B. tabaci* se llevaron a cabo bioensayos sistémicos de ninfas. Para ello, se utilizaron plántulas de algodón de al menos 10 cm de altura y sólo una hoja verdadera de 2 cm de diámetro. Cada una de las hojas se colocó en una caja de polipropileno con ventilación, con unos 40 adultos en su interior y se mantuvieron durante 24 horas en una jaula de cristal y en condiciones de laboratorio (25° C ± 2, 16:8 (L:O) y 60-65% HR), para su oviposición. Tras este periodo de tiempo, se retiraron los adultos. A continuación, se enumeraron las hojas y se contaron los huevos a la lupa (aproximadamente 60-80 huevos/hoja). Se procedió al tratamiento, cuatro dosis (0,5-0,1-0,05-0,01 ppm) con cyazypyr sistémico y un control.

Las plántulas se depositaron individualmente en frascos de cristal de 30 ml con las soluciones insecticidas, y se dejaron durante 13 días en condiciones de laboratorio para que el insecticida actuara.

Se mantuvo de nuevo en condiciones de laboratorio hasta el momento de la lectura del bioensayo, día 14 desde que se inició, considerando como individuos vivos las ninfas en estadio 2 e individuos muertos los huevos no eclosionados y las ninfas muertas.

#### 2.4 Análisis de datos

Los datos se analizaron utilizando el programa POLO-PC para el análisis probit [8].

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestran los valores de CL<sub>50</sub>, obtenidos entre 2015 y 2017, de todos los bioensayos realizados con ciantraniliprol y con ninfas de poblaciones de campo de la cuenca mediterránea de *B. tabaci*.

En general, podemos observar claramente que todas nuestras poblaciones presentan una alta susceptibilidad frente a ciantraniliprol, con valores de CL<sub>50</sub> comprendidos entre 0,022 mg L<sup>-1</sup> (ITA152) y 0,095 mg L<sup>-1</sup> (IS16), lo que supone una variabilidad de 4,3 veces entre la más sensible y la más resistente. Teniendo en cuenta que la dosis de campo de este producto es de 75 mg L<sup>-1</sup>, los datos mostrados son significativamente bajos.

Además, todos nuestros resultados muestran valores similares con la susceptibilidad basal de poblaciones mediterráneas de *B. tabaci* a ciantraniliprol, establecida en estudios previos y siendo datos ya publicados, con un valor de CL<sub>50</sub> de 0,048 (0,034-0,063) mg L<sup>-1</sup> (95% LC) [9], no presentando diferencias significativas en ninguno de los casos.

### 4. CONCLUSIONES

Nuestros resultados documentan la situación actual de alta susceptibilidad a ciantraniliprol en poblaciones de campo de *B. tabaci* de la cuenca mediterránea. Podemos observar claramente que actualmente no se han desarrollado resistencias, al comparar los datos obtenidos durante estos dos últimos años, con la línea base de susceptibilidad a ciantraniliprol en poblaciones de *B. tabaci*, establecida en 2015 [9].

En resumen, ciantraniliprol sigue mostrando una alta eficacia en el control de *B. tabaci* y puede jugar un papel importante en la disminución de la resistencia a insecticidas. A pesar de ello, requiere de un alto nivel de vigilancia, puesto que siempre está presente la amenaza del desarrollo de resistencias, que en el caso de los insecticidas puede ser muy elevada.

### 5. AGRADECIMIENTOS

Agradecer a la financiación del Ministerio español de Economía y Competitividad (MINECO) (AGL2011-25164), a DuPont y a los fondos europeos FEDER.

### 6. REFERENCIAS

- [1] Fernández, E., Grávalos, C., Haro, P. J., Cifuentes, D., Bielza, P. 2009. Insecticide resistance status of *Bemisia tabaci* Q-biotype in south-eastern Spain. *Pest Manag. Sci.* 65: 885-891.
- [2] Palumbo, J. C., Horowitz, A. R., Prabhaker, N. 2001. Insecticidal control and resistance management for *Bemisia tabaci*. *Crop Prot.* 20: 739-765.



- [3] Cordoba, D., Benner, E. A., Sacher, M. D., Rauh, J. J., Sopa, J.S., Lahm, G. P., Selby, T. P., Stevenson, T. M., Flexner, L., Gutteridge, S., Rhoades, D. F., Wu, L., Smith, R. M., Tao, Y. 2006. Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. *Pestic. Biochem. Phys.* 84: 196-214.
- [4] Satelle, D. B., Cordoba, D., Cheek, T. R. 2008. Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals. *Invertebr. Neurosci.* 8: 107-119.
- [5] Li, X., Degain, B. A., Harpold, V. S., Marçon, P. G., Nichols, R. L., Fournier, A. J., Palumbo, J. C., Ellsworth, P. C. 2012. Baseline susceptibilities of B- and Q-biotype *Bemisia tabaci* to anthranilic diamides in Arizona. *Pest Manag. Sci.* 68: 83-91
- [6] Caballero, R., Cyman, S., Schuster, D. J., Portillo, H. E., Slater, R. 2013. Baseline susceptibility of *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B in southern Florida to cyantraniliprole. *Crop Prot.* 44: 104-108.
- [7] Cameron, R., Lang, E. B., Alvarez, J. M. 2014. Use of honeydew production to determine reduction in feeding by *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) adults when exposed to cyantraniliprole and imidacloprid treatments. *J. Econ. Entomol.* 107: 546-550.
- [8] Russell, R. M., Robertson, J. L., Savin, N. E. 1977. POLO – a new computer program for probit analysis. *Bull Entomol. Soc. Am.* 23: 209–213.
- [9] Grávalos, C., Fernández, E., Belando, A., Moreno, I., Ros, C., Bielza, P. 2015. Cross-resistance and baseline susceptibility of Mediterranean strains of *Bemisia tabaci* to cyantraniliprole. *Pest Manag. Sci.* 71: 1030-1036.

**Tabla 1.** Evolución de la resistencia de *B. tabaci* a ciantraniliprol (DC=75)

Población	CL <sub>50</sub> (mg L <sup>-1</sup> ) (95% LC)	FR <sub>50</sub>
ITA152	0,022 (0,006-0,037)	1
ITA151	0,028 (0,003-0,058)	1,3
GRE163	0,028 (0,014-0,044)	1,3
ES161	0,035 (0,030-0,041)	1,6
GRE161	0,036 (0,021-0,049)	1,6
ES151	0,036 (0,024-0,054)	1,6
ES162	0,038 (0,024-0,055)	1,7
GRE162	0,049 (0,029-0,063)	2,2
ITA161	0,058 (0,034-0,089)	2,6
ES152	0,069 (0,048-0,082)	3,1
ES163	0,077 (0,054-0,102)	3,5
IS16	0,095 (0,019-0,155)	4,3

**DC:** Dosis de campo en mg L<sup>-1</sup>. **CL<sub>50</sub>:** Concentración letal 50.  
**LC:** límites de confianza al 95%. **FR:** factor de resistencia con respecto a la población más susceptible de referencia.

## Effects of Biosolarization with fresh sheep manure on soil physical properties of pepper greenhouses in Campo de Cartagena

## Efectos de la biosolarización con estiércol fresco de ovino sobre propiedades físicas del suelo de invernaderos de pimiento del Campo de Cartagena

P. Fernández<sup>1\*</sup>, A. Lacasa<sup>2</sup>, P. Guirao<sup>3</sup>, S. Larregla<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Consejería de Agua, Agricultura y Medio Ambiente de la Región de Murcia. Ctra. De Murcia s/n. Cieza (Murcia).

<sup>2</sup> Dr. Ing. Agrónomo (Murcia).

<sup>3</sup> Universidad Miguel Hernández. Ctra. de Beniel, km 3,2. Orihuela (Alicante).

<sup>4</sup> Dpto. Sanidad Vegetal de NEIKER. Bizkaiko Parke Teknologikoa, 812.L. - Derio (Bizkaia).

\*pedro.fernandez5@carm.es

### **Abstract**

The evaluation of changes in soil physical properties after organic amendments application is relevant when assessing non-chemical alternatives to methyl bromide for pepper crop soil disinfection programs in the Campo de Cartagena. Applying biosolarization with fresh sheep manure at a dose of 10 kg m<sup>-2</sup> implied a soil bulk density reduction in only the shallower soil profile (0-10 cm) when compared with non-disinfected control. The improvement of the cumulative infiltration and infiltration rate have contributed to a better water dynamics in the soil, an aspect of enormous importance in the cultivation of pepper in greenhouses due to its high sensitivity to root asphyxia.

**Keywords:** Bulk density; infiltration; organic amendment; fertility.

### **Resumen**

La evaluación de cambios en las propiedades físicas del suelo tras aplicar enmiendas orgánicas resulta relevante al evaluar alternativas no químicas al bromuro de metilo en programas de desinfección de suelos de cultivos de pimiento en el Campo de Cartagena. La aplicación de la biosolarización a partir de una dosis de 10 kg m<sup>-2</sup> de estiércol fresco de ovino ha supuesto reducir la densidad aparente, únicamente en el primer perfil de suelo (0-10 cm) con respecto al control sin desinfectar. La mejora de la infiltración acumulada y la velocidad de infiltración han contribuido a una mejor dinámica del agua en el suelo, aspecto de enorme importancia en el cultivo de pimiento bajo invernadero debido a su alta sensibilidad a la asfixia radicular.

**Palabras clave:** Densidad aparente; infiltración; enmienda orgánica; fertilidad.

## 1. INTRODUCCIÓN

En la evaluación de alternativas al bromuro de metilo para la desinfección de los suelos de los invernaderos de pimiento del Campo de Cartagena el ensayo se planteó de forma que se

pudiera conocer la viabilidad técnica y económica de la alternativa, la eficacia y la estabilidad en el tiempo de la misma y la sostenibilidad en los habituales sistemas de producción de la comarca.

La biosolarización, evaluada inicialmente como una alternativa a la desinfección química y utilizable en cultivos calificados como ecológicos, fue considerada como una alternativa a las alternativas químicas por: su eficacia [1] para el control de los principales patógenos del suelo (*Phytophthora capsici*, *P. parasítica* y *Meloidogyne incognita*), por la estabilidad en el tiempo de la eficacia desinfectante [2], por las prestaciones agronómicas, al proporcionar cosechas similares a las de los desinfectantes químicos de referencia [3], y, por mitigar los efectos de la fatiga del suelo específica del pimiento, que se acumula como consecuencia del monocultivo reiterado del pimiento en más del 95% de los invernaderos [4].

En el presente trabajo se presentan los resultados tras la primera biosolarización, utilizando estiércol fresco de ovino como enmienda biofumigante, realizados en un invernadero sin antecedentes del cultivo de pimiento, con el suelo exento de patógenos para poder evaluar los efectos sobre las características físicas analizadas.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

La dosis aplicada fue de 10 kg/m<sup>2</sup>, dentro de un programa de reducción progresiva de la enmienda orgánica hasta converger en 2,5 kg/m<sup>2</sup> de estiércol fresco de ovino en 5 años. La superficie de cada parcela elemental era de 75 m<sup>2</sup> cada una tomada al azar.

Las muestras de suelo inalteradas se secaron en estufa a 105°C (sobre papel de filtro o recipiente resistente al fuego) hasta peso constante (24-48 horas con la muestra extendida), determinándose seguidamente el peso seco (con aproximación de 0,1 g.) a la temperatura de referencia [5]. El volumen del cilindro fue de 100 cm<sup>3</sup>. Para ello, se tomaron 9 muestras por tratamiento, 3 por repetición, a 3 profundidades (0-10 cm, 10-20 cm, 20-30 cm).

El método empleado para el cálculo de la infiltración ha sido el de los anillos de Tames-Muntz. El aparato de medida consiste en dos anillos concéntricos de 142 mm de diámetro y otro de 350 mm.

El efecto del anillo exterior es anular el efecto de la infiltración lateral. En estos cilindros se mantiene una altura de agua constante de 5 cm durante todo el tiempo que dura la infiltración. El mecanismo que se emplea para mantener este nivel es un sistema de boyas similar al empleado en las instalaciones ganaderas para bebederos

Para el análisis de la densidad aparente se ha analizado estadísticamente mediante el ANOVA considerando inicialmente como factores cualitativos el perfil de suelo y la repetición. Se han tomado tres perfiles: 0-10, 10-20 y 20-30 cm. La comparación entre medias de los tratamientos se realizó utilizando el test LSD de Fisher al 95% ( $p < 0,05$ ).

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La medida de la densidad aparente tras el proceso de desinfección y previo al trasplante del cultivo de pimiento, presentó diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Estos resultados están en la línea de otros trabajos como los de [6-8], en los que tras la aplicación de enmiendas orgánicas se reduce la densidad aparente de los suelos tratados. En nuestras condiciones, en el único perfil de suelo donde las diferencias han sido significativas ha sido en el primero, de 0 a 10 cm de profundidad (Fig. 1a). La aplicación de 100 t/ha de estiércol fresco de ovino ha reducido la densidad aparente a 1,18 t/m<sup>3</sup>, en comparación con 1,30 t/m<sup>3</sup> de la parcela control, descenso similar tras la aplicación de 250 m<sup>3</sup>/ha de estiércol de pollo, donde la densidad aparente se redujo de 1,16 a 1,04 t/m<sup>3</sup> [9]. La disminución en la da puede ser debido al aumento de agregación, mayor volumen radicular y

poros tras el aporte de materiales orgánicos [10]. [11] justifican el descenso por la menor densidad de los materiales orgánicos frente a las partículas minerales del suelo. Una combinación de ambas podría dar respuesta a los beneficios de la aplicación de estiércol fresco de ovino en la da, tal y como apuntan [12]. Este descenso en el primer año de la experiencia ha supuesto ventajas en el enraizado del cultivo y en la dinámica del agua.

Tanto la infiltración acumulada (Fig. 1b) como la velocidad de infiltración (Fig. 2) mejoraron en los tratamientos biosolarizados. [13] demostraron el aumento de la infiltración tras la aplicación de estiércol vacuno, mientras que para [14] la adición de enmiendas orgánicas no afectó significativamente a la infiltración acumulada de agua, aunque hubo una tendencia hacia una mayor infiltración en el tratamiento con estiércol de vacuno.

La función de infiltración ajustada [15] a cada tratamiento fue, para el caso del testigo de:  $y=0,9206x^{0,6067}$  y para el tratamiento con la enmienda:  $y=2,0376x^{0,5106}$

Los valores de Kd y de Ks del tratamiento testigo son inferiores al tratamiento de biosolarización. Mientras que Kd en el control es de 29,33 cm/h, en el tratado es de 55,61 cm/h. La Ks es de 3,37 y 3,58 cm/h, respectivamente. Estos resultados son similares a los obtenidos por [16] en diferentes suelos al aire libre e invernaderos de Campo de Cartagena (Murcia).

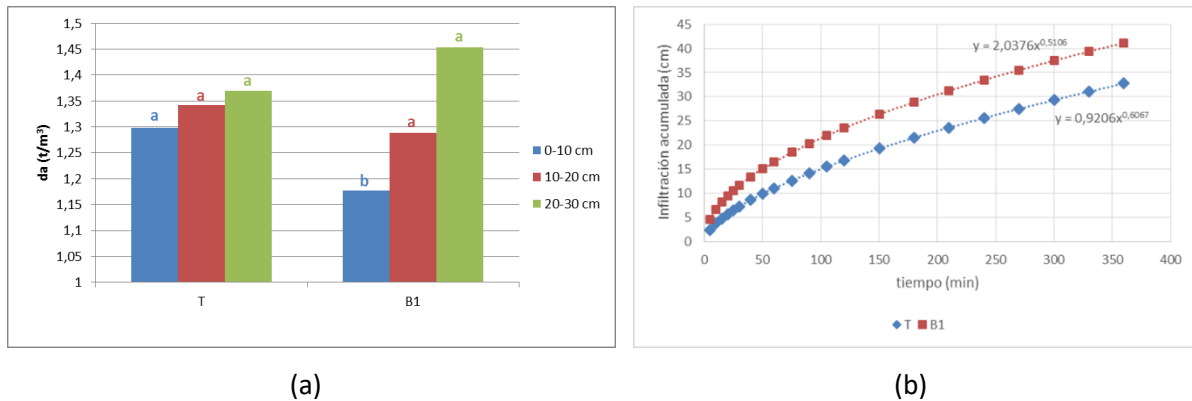
#### 4. CONCLUSIONES

La aplicación de 100 t/ha de estiércol fresco de ovino bajo la técnica de biosolarización ha disminuido la densidad aparente del suelo y mejorado la infiltración. Los cambios en las propiedades físicas, tras la primera biodesinfección, son de gran importancia para el cultivo de pimiento cultivado en la comarca del Campo de Cartagena, debido a su alta sensibilidad a la asfixia radicular.

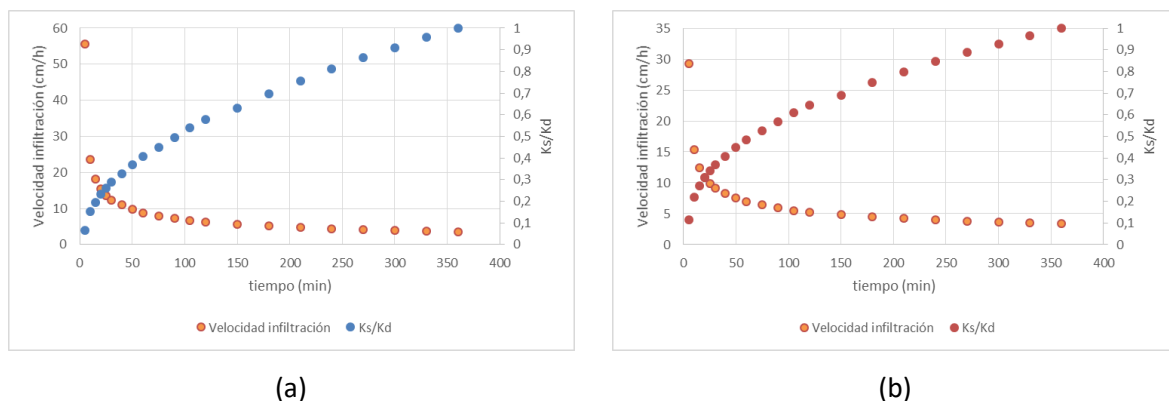
#### 5. REFERENCIAS

- [1] Lacasa, A., Guerrero, M. M., Guirao, P. y Ros, C. 2002. Alternatives to Methyl Bromide in sweet pepper crops in Spain. Proceedings of International Conference on Alternatives to Methyl Bromide. T. Batchelor and J. M. Bolivar Ed. European Commission: 172-177.
- [2] Guerrero, M. M., Lacasa, A., Ros, C., Bello A., Martínez M. C., Torres J. y Fernández, P. 2004. Efecto de la biofumigación con solarización sobre los hongos del suelo y la producción: fechas de desinfección y enmiendas. En A. Lacasa, MM. Guerrero, M. Oncina y JA. Mora Eds. Desinfección de suelos en invernaderos de pimiento. Publicaciones de la Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. Región de Murcia. Jornadas 16: 209-238.
- [3] Guerrero M.M., Ros C., Martínez M.A., Martínez M.C., Bello A., Lacasa A. 2006. Biofumigation vs biofumigation plus solarization to control *Meloidogyne incognita* in sweet pepper. IOBC-WPRS Bulletin 29: 313-318. In: Castañé C and Sánchez JA (eds.), Proceedings of the meeting at Murcia (Spain), 14-18 May 2006. Working group "Integrated Control in Protected Crops, Mediterranean Climate".
- [4] Guerrero M.M., Lacasa C.M., Hernández A., Martínez V., Martínez M.C., Fernández P., Lacasa A. 2014. Biosolarization with agroindustrial by product for the control of soilborne pathogens in protected pepper crops in Southeast Spain. Acta Horticulturae 1044: 157-161.
- [5] USSLS (United States Salinity Laboratory Staff). 1954. Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. Handbook 60. Riverside, CA. 160 pp.
- [6] Tester C.F. 1990. Organic amendment effects on physical and chemical properties of a sandy soil. Soil Sci. Soc. Am. J. 54: 827-831.
- [7] Ekwue E.I. 1992. Effect of organic and fertilizer treatments on soil physical properties and erodibility. Soil and Tillage Research, 22: 199-209.
- [8] Liu B., Tu C., Hu S., Gumpertz M., Ristaino J.B. 2007. Effect of organic, sustainable, and conventional management strategies in grower fields on soil physical, chemical, and biological factors and the incidence of Southern blight. Applied Soil Ecology 37, 3: 202-214.

- [9] Forge T., Kenney E., Hashimoto N., Neilsen D., Zearth B. 2016. Compost and poultry manure as preplant soil amendments for red raspberry: Comparative effects on root lesion nematodes, soil quality and risk of nitrate leaching. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 223: 48-58.
- [10] Bappa D., Debashis C., Vinod S., Mukhtar A., Amit S., Arijit B. 2016. Evaluating fertilization effects on soil physical properties using a soil quality index in an intensive rice-wheat cropping system. *Pedosphere*, 26, 6: 887-894.
- [11] Bronick C., Lal R. 2005. Soil structure and management: a review. *Geoderma* 124: 3-22.
- [12] Kay B.D., Da Silva A.P., Baldock J.A. 1997. Sensitivity of soil structure to changes in organic C content: predictions using pedotransfer functions. *Canadian Journal of Soil Science*, 77: 655-667.
- [13] Mathers A.C., Stewart B.A., Thomas J.D. 1977. Manure effects on water intake and runoff quality from irrigated grain sorghum plots. *Soil Science Society of America Journal* 41: 782-785.
- [14] Assefa B.A., Schoena J.J., Grevers M.C.J. 2004. Effects of four annual applications of manure on Black Chernozemic soils. *Can. Biosyst. Eng.*, 46, 6: 39-46.
- [15] Kostiakov A. N. 1932. On the dynamics of the coefficient of water percolation in soils and on the necessity for studying it from a dynamic point of view for purposes of amelioration. In: *Trans., 6th Comm. Int. Soc. Soil Sci., Russian Part A*: 17-21.
- [16] Fernández P., Aróstegui J.L., Alcalá F.J., Tadei D., Lacasa A. 2014. Determinación del origen del ion bromuro detectado en cultivos del Campo de Cartagena. *Consejería de Agua, Agricultura y Medio Ambiente*. pp: 32.



**Figura 1.** Medida de la densidad aparente en invernadero biosolarizado (a) y Infiltración acumulada para un tiempo de medida de 360 min (b). T: testigo; B1: primera biosolarización. Valores medios con la misma letra no difieren significativamente entre si según prueba LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ).



**Figura 2.** Velocidad de infiltración y cálculo de la  $K_s/K_d$  para el tratamiento testigo (a) y primera biosolarización (b).  $K_s$ : conductividad hidráulica saturada,  $K_d$ : conductividad hidráulica del suelo seco.

## ABA-overproduction response under salinity

### Respuesta a la sobreproducción de ABA en salinidad

A. Martínez-Pérez<sup>1\*</sup>, A. Ferrández-Ayela<sup>2</sup>, A.B. Sánchez-García<sup>2</sup>, A. Albacete<sup>1</sup>, Z. Kevei<sup>3</sup>, L. Estellés<sup>3</sup>, F. Mohareb<sup>3</sup>, A. Thompson<sup>3</sup>, M. Gifford<sup>4</sup>, J.M. Pérez-Pérez<sup>3</sup>, F. Pérez-Alfocea<sup>1</sup>, C. Martínez-Andújar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Plant Nutrition, CEBAS-CSIC, Murcia, Spain.

<sup>2</sup>Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Elche, Alicante, Spain.

<sup>3</sup>Cranfield Soil and AgriFood Institute, Cranfield University, Cranfield, Beds, United Kingdom.

<sup>4</sup>Life Sciences, University of Warwick, Coventry, United Kingdom.

\* ascen.mp@gmail.com

#### Abstract

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

**Keywords:** phytohormone; transgenic; gene expression; microarray.

#### Resumen

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

**Palabras clave:** fitohormona; transgénico; expresión de genes; microarrays.

## 1. INTRODUCTION

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

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

## 2. MATERIALS Y METHODS

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

### 2.1 Short-term hydroponic experiments.

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

### 2.2 Long-term greenhouse experiments

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

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

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

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

### 4. CONCLUSIONS

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

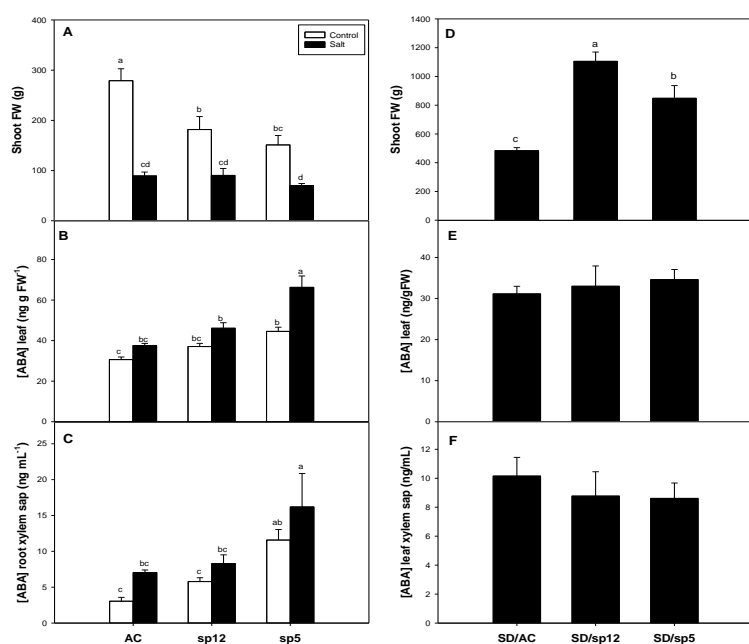
### 5. ACKNOWLEDGEMENTS

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

### 6. REFERENCES

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

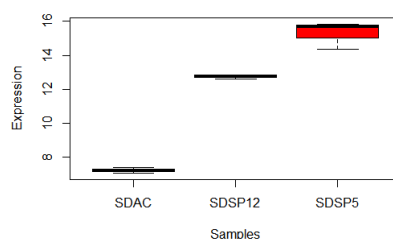




**Figure 1.** Final shoot FW (A), ABA concentration in the leaf (B) and in the root xylem sap (C) of the WT and the two transgenic lines after 21 days of hydroponic culture under control and salinity (100 mM NaCl) treatment. Final shoot FW (D), ABA concentration in the leaf (E) and in the leaf xylem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

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

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



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

## Assessment of fruit quality of grapefruit at postharvest influenced by reclaimed water and deficit irrigation

## Evaluación de la calidad en postcosecha de pomelos regados con agua regenerada y déficit hídrico

C. Romero-Trigueros<sup>1\*</sup>, P.A. Nortes<sup>1</sup>, M. Parra<sup>1</sup>, J.M. Bayona<sup>1</sup>, J.J. Alarcón<sup>1</sup>, E. Nicolás<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC). Campus Universitario de Espinardo, Espinardo, 30100. Murcia (Spain).

\*cromero@cebas.csic.es

### **Abstract**

The aim of our research was to discover the effects of the long-term irrigation with saline reclaimed (RW) and transfer (TW) water and different irrigation strategies: control (C) and regulated deficit irrigation (RDI) on fruit quality of grapefruit during cold storage. Result showed sugar/acid ratio was mainly increased by RDI, but also by RW, due to an important increase in soluble solid content. However, RDI combined with RW, significantly decreased the number of fruits in the largest category 5 at the end of cold storage and TW-RDI showed lower values of juice content.

**Keywords:** cold storage; fruit diameter; juice content; peel thickness; soluble solid content.

### **Resumen**

El objetivo de la investigación fue evaluar los efectos a largo plazo del riego con agua regenerada (AR) y agua del trasvase (AT) y diferentes estrategias de riego (control, C, y riego deficitario controlado, RDC) sobre la calidad de pomelos durante su almacenamiento en frío. Los resultados mostraron que el riego con AR y, principalmente, el RDC incrementaron la cantidad de sólidos solubles, mejorando así el índice de madurez. Sin embargo, el AR combinada con RDC disminuyó el nº de frutos de la categoría de mayor tamaño al final del almacenaje y AT-RDC presentó el menor contenido en zumo.

**Palabras clave:** almacenamiento en frío; contenido de sólidos solubles; contenido en zumo; diámetro de fruto; espesor de corteza.

## **1. INTRODUCTION**

Current climate change predictions indicate increases in the frequency of drought periods for Mediterranean areas. In order to overcome this, the development of strategies to optimize water productivity at field is needed. A useful approach is regulated deficit irrigation (RDI), where water deficits are imposed during phenological periods least sensitive to water stress, with little or no impact on fruit quality. In fact, RDI has been shown to improve fruit quality in Citrus [1], a crop with species of great economical relevance in the Mediterranean and worldwide. Moreover, the use of non-conventional water sources such as reclaimed water (RW) is also an alternative in these regions. RW can be beneficial to crops due to its high macronutrient concentration, considering that an excess of them could be lost through leaching [2]. Besides, RW may imply risks to agriculture due to its salt concentration, resulting in negative impacts on fruit quality [3]. However, suitable use of RW can increase the juice soluble solid content and titratable acidity [4].

The maintenance of fruit quality depends on storage conditions to a great extent but environmental conditions and agronomic factors, such as the water quality and irrigation strategies, also have a marked influence on fruit quality at postharvest. The experiment reported here is the first one to evaluate of grapefruit quality after being irrigated with RW and RDI for eight years at field. The aims of this study were to assess the effects of these strategies on fruit quality at postharvest during cold storage for 31 days.

## 2. MATERIALS AND MHEOTDS

The experimental plot was cultivated with 'Star Ruby' grapefruit (*Citrus paradisi Macf*). Two different water sources were used: The first one was pumped from the Tajo-Segura canal (transfer water, TW) and the second one was pumped from a tertiary wastewater treatment plant (reclaimed water, RW) with high levels of salinity and N, P and K. Two irrigation treatments were established: i) Control (C) irrigated to fully satisfy crop water requirements (100% ET<sub>c</sub>); ii) Regulated Deficit Irrigation (RDI) which received half the water amount applied to the C (50% ET<sub>c</sub>) during the second stage of fruit development.

Ninety fruits per treatment were stored in darkness at 10 °C and 85% RH for 31 days. Quality parameters were measured on 15 fruits per treatment at 0, 10, 17, 24 and 31 storage days. Weight loss was determined at every sampling date in 10 marked fruits per treatment. The quality parameters evaluated included peel thickness, color index, juice content, soluble solid content (SSC), titratable acidity (TA) and SSC/TA ratio. Peel color was measured using a Minolta CR-300 colorimeter at two locations around fruit equatorial plane. Hunterlab parameters L, a and b were used, and color index was calculated as  $(a \times 1000) / (L \times b)$ , where L indicates lightness and a and b are the chromaticity coordinates. Juice content was calculated as juice weight/fruit weight  $\times 100$ . SSC and TA were measured according to [3]. SSC/TA ratio was used for an indication of perception of taste by the consumer and expression of juice quality. Finally, commercial categories were established for fruit of postharvest according to Codex Standards for grapefruit [5]. A weighted analysis of variance (ANOVA; statistical software IBM SPSS Statistics v.21 for Windows) followed by HSD Tukey 's test ( $P \leq 0.05$ ) were used for assessing differences among treatments. The percentage values were arcsine-transformed before statistical analysis.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

At the beginning of postharvest, no significant differences in peel thickness, color index and TA were observed among treatments (Fig. 1). Throughout the cold storage, fruit weight loss was significantly different between treatments (being greater in RW-C and lower in RW-RDI) and, in addition, it was also significantly different across time (p-value: 0.036) (Fig. 1A). Fruit diameter decreased during storage in all treatments, as expected. RW-RDI showed significantly lower values than the rest of the treatments from the beginning of storage (Fig. 1B); this was related with the lower fruit weight loss found in RW-RDI. Peel thickness decreased similarly in all treatments throughout the storage; therefore, one of the causes of weight loss could be that. Besides, the transpiration occurs in a greater proportion in the skin of the fruit than in the pulp as reported [6]. On the contrary, color index showed a tendency to increase during storage, mainly in Control treatments (Fig. 1D). The low temperature during storage probably resulted in a decrease in the chlorophyll/carotenoid ratio of the flavedo because chlorophyll was degraded over time [7]. Juice content also increased during storage (Fig. 1E), since it is based on fruit weight; TW-RDI showed significantly lower values than the rest of the treatments. Moreover, despite that grapefruit is a non-climacteric fruit, SSC increased during postharvest and it was probably due to a concentration effect by weight loss (Fig. 1F). TA, conversely, did not show a clear trend over time (Fig. 1G). Finally, SSC/TA ratio also did not have an evident trend through the storage. However,

last day of the postharvest it was enhanced by water restriction, although also by the use of RW and their combination due to higher SSC values, increasing the differences already observed between treatments at harvest and 0 storage day (Fig. 1H). This result is important since grapefruit juices are produced by industries all over the world due to the preference of consumers based on its taste [8]. A positive linear correlation between SSC and preharvest water deficit was found by [9] for mandarin. Finally, at 0 day of storage, water quality did not affect fruit size. However, water restriction resulted in a smaller fruit size (Fig. 2). At the end of storage, as expected, all treatments decreased the percentage of category 3 fruits and increased those of categories 4 and 5; mainly TW-RDI and RW-RDI which increased category 5 by 20 and 30%, respectively.

#### 4. CONCLUSIONS

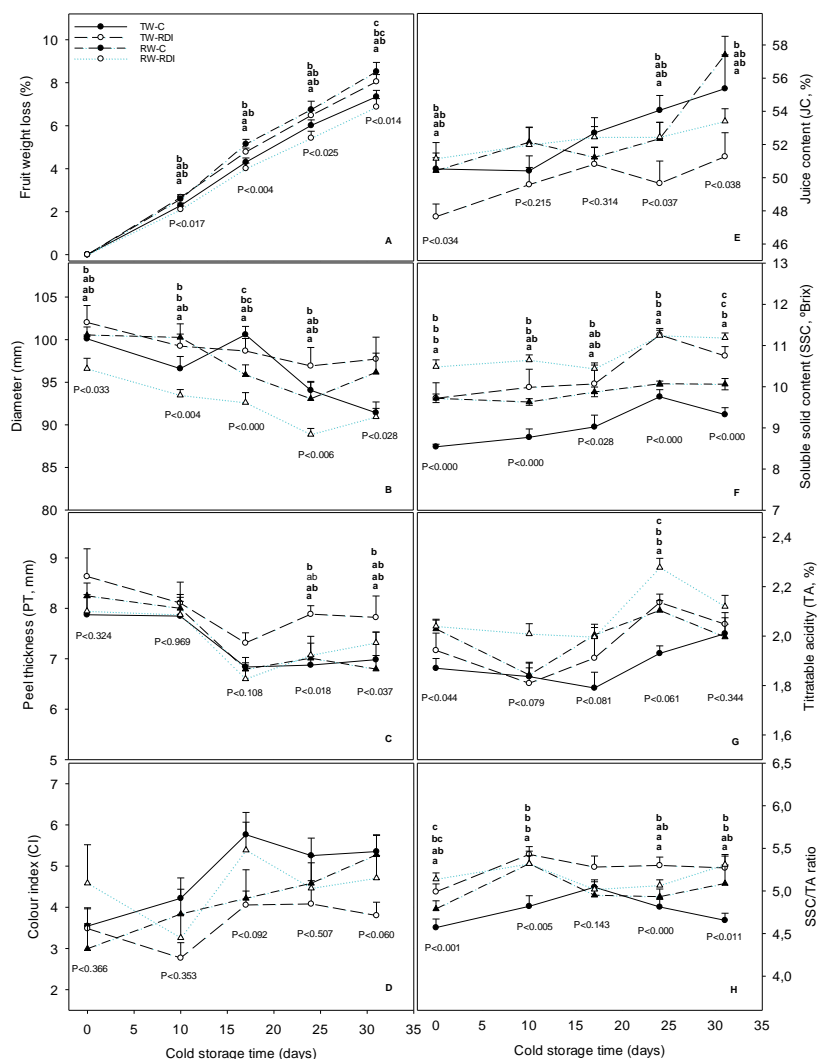
The novelty of this study lies in the evaluation of grapefruit quality after being irrigated with RW and RDI for 8 years under field conditions. The findings of this study suggest that the application of both RDI and RW resulted in an improvement in perception of taste by the consumer due to the increasing of soluble solid content. Besides, water quality did not affect fruit size although water restriction resulted in a smaller fruit size. When RW was combined with RDI the number of fruits of small category (n<sup>o</sup>5) at the end of postharvest was increased.

#### 5. ACKNOWLEDGMENT

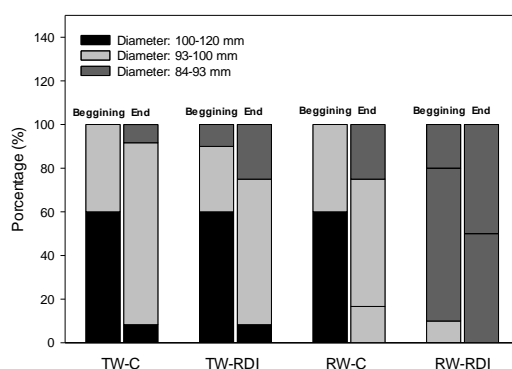
This study was supported by two CICYT projects (AGL2010-17553 and AGL2013-49047-C2- 515 2-R) projects and SENECA-Excelencia Científica (19903/GERM/15).

#### 6. BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- [1] García-Tejero I., Jiménez-Bocanegra J.A., Martínez G., Romero R., Durán-Zuazo V.H., Muriel-Fernández J.L. 2010. Positive impact of regulated deficit irrigation on yield and fruit quality in a commercial citrus orchard. *Agr. Water Manage.* 97: 614-622.
- [2] Romero-Trigueros C. Nortes P.A. Alarcón J.J., Nicolás E. 2014. Determination of 15N stable isotope natural abundances for assessing the use of saline reclaimed water in grapefruit. *Environ. Eng. Manag. J.* 13(10): 2525-2530.
- [3] Nicolás E., Alarcón J.J., Mounzer O., Pedrero F., Nortes P.A., Alcobendas R., Romero-Trigueros C., Bayona J.M., ...Maestre-Valero J.F. 2016. Long-term physiological and agronomic responses of mandarin trees to irrigation with saline reclaimed water. *Agr. Water Manage.* 166: 1-8.
- [4] Navarro J.M., Pérez-Pérez J.G., Romero P., Botía P. 2010. Analysis of the changes in quality in mandarin fruit, produced by deficit irrigation treatments. *Food Chem.* 119: 1591-1596.
- [5] Codex Stan-219. 1999. Emd, 2-2005. [www.fao.org/input/.../standards/345/CXS\\_219e.pdf](http://www.fao.org/input/.../standards/345/CXS_219e.pdf) [01/01/216]
- [6] Yapó B.M. 2009. Pectin quantity, composition and physicochemical behavior as influenced by the purification process. *Food Res. Int.* 42(8): 1197-1202.
- [7] Power J.P., Legar K., Shervin A. 1997. Parameters relating to citrus chilling sensitivity. *Citrus J.* 7(5): 22-24.
- [8] La Cava E.L.M., Sgroppo S.C. 2015. Evolution during refrigerated storage of bioactive compounds and quality characteristics of grapefruit [*Citrus paradisi* (Macf.)] juice treated with UV-C light. *LWT-Food Sci. Technol.* 63(2): 1325-1333.
- [9] Conesa M.R., García-Salinas M.D., de la Rosa J.M., Fernández-Trujillo J.P. Domingo R., Pérez-Pastor A. 2014. Effects of deficit irrigation applied during fruit growth period of late mandarin trees on harvest quality, cold storage and subsequent shelf-life. *Sci. Horti.* 165: 344-351.



**Figure 1.** Seasonal pattern of fruit quality. Each point is the average  $\pm$ SE of the measurements performed in 15 fruits per treatment. Within each date, P-value and different letters indicate differences among treatment by ANOVA analysis followed of HSD Tukey’s test ( $P \leq 0.05$ ).



**Figure 2.** Percentage of fruit size category for each treatment. Fruit diameters 100-120, 93-100 and 84-93 mm correspond to categories 3, 4 and 5, respectively. “Beginning” and “End” above the bars means at the beginning and at the end of storage.

## A new approach to ascertain the sensitivity to water stress of different plant water indicators

## Un nuevo enfoque para determinar la sensibilidad al déficit hídrico de indicadores de estado hídrico de la planta

J.M. De la Rosa<sup>1\*</sup>, MR. Conesa-Saura<sup>1</sup>, R. Domingo<sup>1</sup>, C. Castillo<sup>1</sup>, A. Temnani<sup>1</sup>, A. Pérez-Pastor<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). Dpto. Producción Vegetal. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203. Cartagena (Murcia).

\*josemdlrs@hotmail.com

### Abstract

The sensitivity to water stress of different plant water indicators was evaluated during the late postharvest period of extra-early nectarine trees growing in a commercial orchard and submitted to two irrigation treatments: (i) a control (TC), irrigated at 120% of crop evapotranspiration to avoid any soil water limitations, and (ii) a water deficit treatment (TD), irrigated at 50% of TC. The plant indicator studied were: the maximum daily trunk shrinkage (MCD); trunk growth rate (TCD); midday stem water potential ( $\Psi_T$ ); leaf conductance (Gs); and net photosynthesis (Pn). Although the highest signal intensity (SI) values -the ratio of deficit irrigation treatment values to control values- were reached by TGR, Gs and Pn (2.6, 3 and 2.9, respectively), the sensitivity (S) values- calculated as the ratio of SI to coefficient of variation ( $SI \cdot CV - 1$ )- were higher in  $\Psi_T$  and MDS (14 and 11.4, respectively), since their CV values were the lowest (11 and 14%, respectively). A new approach ( $S^*$ ) is proposed to calculate the sensitivity of the plant water indicators, since the standard method can result in high sensitivity values without identifying differences between irrigation treatments.

**Keywords:** Maximum daily trunk shrinkage; Midday stem water potential; Trunk growth rate; Water deficit.

### Resumen

Se evaluó la sensibilidad al déficit hídrico de diferentes indicadores de estado hídrico del cultivo durante la poscosecha tardía de nectarinos extra-tempranos, en una finca comercial en la que se dispusieron dos tratamientos de riego: (i) Un control (TCTL), regado al 120 % de la evapotranspiración potencial de cultivo a fin de evitar condiciones limitantes de agua en el suelo y (II) un tratamiento de déficit hídrico (TD), regado al 50 % de TC. Los indicadores estudiados fueron: máxima contracción de tronco (MCD); tasa de crecimiento diario de tronco (TCD), potencial hídrico de tallo al mediodía ( $\Psi_T$ ); conductancia estomática foliar (Gs); y fotosíntesis neta (Pn). Los mayores valores de intensidades de señal (SI) -ratio de los valores de TD y TCTL- se alcanzaron en TCD, Gs y Pn (2.6, 3, y 2.9, respectivamente), los valores de sensibilidad (S) -calculados como el ratio IS entre coeficiente de variación de las medidas ( $IS \cdot CV - 1$ )- fueron altos en  $\Psi_T$  y MCD (14 y 11.4, respectivamente), sin embargo sus coeficientes de variación fueron los menores (11 y 14 %, respectivamente). Se propone un nuevo enfoque ( $S^*$ ) para calcular la sensibilidad de los indicadores de estado hídrico de la planta, ya que el método tradicional puede generar altos valores de sensibilidad sin que se identifiquen diferencias entre tratamientos de riego.

**Palabras clave:** máximo contracción de diámetro de tronco; potencial hídrico de tallo al mediodía; tasa de crecimiento diaria; déficit hídrico.

## 1. INTRODUCCIÓN

La programación del riego en base al estado hídrico de la planta se postula como una herramienta útil para mejorar la eficiencia del uso del agua de riego ya que las medidas en planta integran factores climáticos y de estado hídrico del suelo. Algunas cualidades deseables que un indicador del estado hídrico de la planta debiera tener a fin de poderlo utilizar en la programación del riego son: i) Sensibilidad al déficit hídrico; ii) Posibilidad de automatizar las medidas; iii) rápida respuesta al déficit hídrico; iv) proporcionalidad de las medidas con el nivel de déficit aplicado. Para evaluar la sensibilidad al déficit hídrico de un indicador se utiliza la relación entre intensidad de señal y ruido [1]. Siendo el ruido el coeficiente de variación de las medidas del indicador en el tratamiento deficitario.

Los objetivos de este trabajo son: i) evaluar la utilidad de indicadores del estado hídrico de la planta (máxima contracción diaria de tronco (MCD), tasa de crecimiento diaria del tronco (TCD), potencial hídrico del tallo a mediodía ( $\Psi_T$ ), conductancia estomática (Gs) y fotosíntesis neta (Pn)) para la programación del riego en nectarino extratemprano; ii) evaluar la idoneidad de un nuevo algoritmo para determinar la sensibilidad de indicadores al déficit hídrico.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Condiciones experimentales

El estudio se llevó a cabo en 2012 durante la postcosecha del cultivo (entre los días del año 167 y 302) en una finca comercial situada en Murcia (38° 8' N; 1° 13' W). Se seleccionó una parcela experimental de 2 ha con nectarinos extratempranos (*Prunus persica* cv. 'Viowhite'), distribuidos en un marco de plantación de 6 x 3.5 m.

Se ensayaron dos tratamientos de riego: un control ( $T_{CTL}$ ), regado para satisfacer las necesidades hídricas totales del cultivo y un deficitario ( $T_D$ ) regado al 50% de  $T_{CTL}$ . El riego se programó semanalmente y se aplicó diariamente por la noche a lo largo de todo el periodo de estudio. El diseño experimental consistió en tres repeticiones por tratamiento, distribuidas en bloques al azar. Cada repetición tenía tres filas de 15 árboles por fila. Las medidas se realizaron en la fila central.

### 2.2. Medidas realizadas

El contenido volumétrico de agua en el suelo se midió semanalmente en el perfil 0-100 cm con una sonda portátil FDR (Diviner 2000, Sentek Pty. Ltd., South Australia). La fluctuación de diámetro del tronco fue monitoreada en cada tratamiento con 6 sensores de desplazamiento lineal (LVDT; Solartron Metrology, Bognor Regis, UK, model DF  $\pm$  2.5 mm, precisión  $\pm$  10  $\mu$ m). Se determinó MCD como la diferencia entre el máximo (MXDT) y el mínimo diámetro de tronco (MNDT), que tuvieron lugar al alba y por la tarde, respectivamente y TCD como la diferencia de dos MXDT de días consecutivos.

Semanalmente, en los árboles con sensor, se midió el potencial hídrico de tallo ( $\Psi_T$ ) a mediodía solar, en hojas sanas, adultas, cercanas al tronco y envueltas con film de plástico y papel de aluminio al menos dos horas antes de su medida. Para las medidas se utilizó la cámara de presión (Soil Moisture Equipment Corp. Model 3000).

La conductancia estomática (Gs) y fotosíntesis neta (Pn) se midió los mismos días que  $\theta_v$  y  $\Psi_T$  con ciras2 (PPSystem, Hitchin, Herfordshire, UK).

### 2.3. Intensidad de señal, coeficiente de variación y sensibilidad

A fin de poder comparar intensidades de señal, coeficientes de variación y sensibilidad de indicadores solamente se utilizaron los datos de los días en que se tenían medidas de todos los indicadores. Además, las medidas se realizaban siempre en los mismos árboles, una por árbol para

cada indicador. De esta forma fijamos las variables referidas al día de muestreo, tipo y tamaño de la muestra. La intensidad de señal se calculó para cada indicador como la relación entre los valores ( $V$ ) de  $T_D$  y  $T_{CTL}$ . En el caso de MCD y  $\Psi_T$ :  $Is=V_D/V_{CTL}$ ; y para TCD, Gs y Pn:  $Is=V_{CTL}/V_D$ . Para determinar el “ruido” se calculó el coeficiente de variación (CV) de las medidas de cada indicador.

La sensibilidad al estrés hídrico ( $S$ ) se determinó mediante dos algoritmos:

- i) Tradicional ( $S$ ). Propuesto por Goldhamer (2000), es un procedimiento comúnmente utilizado para determinar la sensibilidad de un indicador. Tiene el inconveniente de presentar valores altos de sensibilidad sin diferencias entre tratamientos cuando el coeficiente de variación es cercano a cero.
- ii) Corregido ( $S^*$ ). Se define como la cantidad de veces que el ruido (CV) puede repetirse dentro del diferencia comprendida entre la intensidad de señal del tratamiento deficitario ( $IS$ ) y la del control (1). La interpretación de los valores obtenidos es la siguiente:
  - a.  $S^*>0$ : sensibilidad al déficit hídrico, mayor cuanto mayor sea  $S^*$ ;
  - b.  $S^*=0$ : no sensible al déficit hídrico;
  - c.  $S^*<0$ : Comportamiento anómalo. Ocurre cuando  $T_D$  adquiere valores esperables en el  $T_{CTL}$ .

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

MCD fue significativamente superior en  $T_D$  a partir desde el día 175 hasta el día 272. Posteriormente  $T_{CTL}$  y  $T_D$  presentaron valores de MCD muy similares, sin diferencias significativas entre tratamientos.  $T_{CTL}$  mostró valores de TGR significativamente superiores a  $T_D$  desde el día 179 hasta el día 245. Además,  $T_{CTL}$  mostró valores de  $\Psi_T$  inferiores a los de  $T_D$  durante todo el periodo de déficit. Gs y Pn tardaron más en detectar el estrés hídrico, mostrando diferencias significativas a partir de la tercera semana de déficit.

Durante julio, agosto y septiembre todos los indicadores estudiados presentaron valores relativamente altos de  $IS$ , entre 1.4 y 2.9. Sin embargo, en octubre  $IS$  disminuyó sensiblemente, debido a la copiosa precipitación del día 272 y a la baja demanda climática. En octubre, la  $IS$  de MCD fue 1 frente a 1.2 de  $\Psi_T$ . En julio, TCD registró la mayor  $IS$ , coincidiendo con el periodo de rápido crecimiento del tronco. A partir de julio la  $IS$  en TCD fue disminuyendo progresivamente mostrando incluso valores inferiores a 1 en octubre lo que es achacable a un crecimiento compensatorio del tronco en  $T_D$  tras la precipitación del día 272. Gs y Pn mostraron los valores más elevados de  $IS$ , excepto en julio.

MCD y  $\Psi_T$  han sido los indicadores que presentaron menores CV (entre 0.10 y 0.16). En cambio, TCD, Gs y Pn mostraron los valores más altos (entre 0.22 y 0.94).

$\Psi_T$  ha sido el indicador que ha presentado los valores más altos de  $S$  durante julio, agosto y septiembre (entre 13.6 y 18.2). En cambio, en octubre MCD con 7.3 fue el indicador que presentó mayor  $S$ . TGR, Gs y Pn presentaron valores de  $S$  inferiores a 7 durante todo el periodo de déficit.

MDS y  $\Psi_T$  han sido los indicadores que presentaron menores CV (entre 0.10 y 0.16). En contrapartida, TCD, Gs y Pn estos fueron más elevados (entre 0.22 y 0.94).

Según los resultados de todo el periodo  $\Psi_T$  mostró la mayor  $S$  (14.0), seguido de MCD (11.4), Gs (5.4), Pn (3.7) y TCD (2.9).

En cambio, en octubre MCD presentó un valor de  $S$  superior al de  $\Psi_T$ , a pesar de que no mostrase diferencias entre tratamientos (MCD media de 175 y 179  $\mu\text{m}$  para  $T_D$  y  $T_{CTL}$ , respectivamente). Este resultado fue promovido por los bajos valores de CV, lo cual no es suficiente para poder considerar que un indicador es sensible al déficit hídrico. Una condición necesaria para considerar que un indicador es sensible es que éste muestre diferencias ( $IS>1$ )



cuando se aplica riego deficitario. Por esta razón  $S^*$  es 0 cuando  $IS=1$ . Así, en octubre MCD presenta una  $S^*$  de 0.2, inferior a la de  $\Psi_T$  (1.2).

En octubre  $\Psi_T$  tampoco es el indicador más sensible al déficit hídrico según  $S^*$ , ya que  $G_s$  y  $P_n$  presentan valores de  $S^*$  superiores a los de  $\Psi_T$ . Esto no ocurría con los registros de  $S$ . Además, en octubre TCD mostró valores negativos de  $S^*$  que se explican por un mayor crecimiento del tronco en TD debido al crecimiento compensatorio que tiene lugar tras la lluvia del día 272.

#### **4. CONCLUSIONES**

En general MCD y  $\Psi_T$  han presentado, como era de esperar, una elevada sensibilidad al déficit hídrico. MCD tiene un valor añadido como indicador, por ser fácilmente automatizable. El algoritmo tradicionalmente utilizado para determinar la sensibilidad de un indicador puede generar valores altos sin que existan diferencias entre tratamientos. Por esta razón se propone una corrección, de forma que indicadores que no presentan diferencias entre tratamientos tendrían una sensibilidad nula.

#### **5. AGRADECIMIENTOS**

Este estudio fue subvencionado por el Ministerio Español de ciencia e innovación (AGL2010-19201-C04-04), y el proyecto europeo SIRRIMED (FP7-KBBE-2009-3-245159).

#### **6. REFERENCIAS**

[1] Goldhamer, D.A., Fereres, E., 2001. Irrigation scheduling protocols using continuously recorded trunk diameter measurements. *Irrig. Sci.* 20, 115–125.

## Damping effect of rootstocks on pepper plants against saline stress

## Efecto amortiguador de los portainjertos en plantas de pimiento frente a estrés salino

A. Gálvez<sup>1\*</sup>, J. López-Marín<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hortofruticultura, IMIDA (Instituto Murciano de I+D Agrario y Alimentario). C/ Mayor s/n La Alberca. 30150 (Murcia), España. (www.imida.es)

\*1297@coitarm.es.

### **Abstract**

Saline stress is among those classified as abiotic, one of the highest incidence in arid and semi-arid regions, being one of the main environmental irregularities that limits its growth and reduces its productivity. Among the plant species that are grown in the Mediterranean area, the pepper occupies a primordial place, being considered sensitive to salinity. The objective of this work was to study the damping effect of the portagrafts in pepper plants in greenhouse in front of saline stress. The experiment was carried out in a greenhouse, growing the plants in containers of 10 L capacity, on a mixture of horticultural substrate, sand and vermiculite. The commercial variety used was 'Gacela', which was grafted onto the grafts 'Atlante', 'Creonte' and 'Terrano', and their behaviors were compared with those of the grafted variety on itself and without grafting. The effects were evaluated on: vegetative, photosynthetic and production. The results indicated that saline stress affected the yields of all combinations of portagrafts, occurring to a lesser extent with 'Creonte' and 'Atlante', with 44.5 and 43.7%, respectively, and finding that this decrease was raised to 54.1 and 60%, in cases of grafting autograft of the variety and grafting without grafting.

**Keywords:** *Capsicum annuum*; salinity; yield; grafting.

### **Resumen**

El estrés salino es, dentro de los clasificados como abióticos, uno de los de mayor incidencia en los cultivos de regiones áridas y semiáridas, siendo una de las principales irregularidades medioambientales que limita su crecimiento y reduce su productividad. De entre las especies vegetales que se cultivan en el área mediterránea, el pimiento ocupa un lugar primordial, considerándose sensible a salinidad. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto amortiguador que ejercen los porta-injertos en plantas de pimiento en invernadero frente a estrés salino. El ensayo se llevó a cabo en invernadero, cultivando las plantas en contenedores de 10 L de capacidad, sobre una mezcla de sustrato hortícola, arena y vermiculita. La variedad comercial utilizada fue 'Gacela', que fue injertada sobre los porta-injertos, 'Atlante', 'Creonte' y 'Terrano', y sus conductas fueron comparadas con las de la variedad injertada sobre sí misma y sin injertar. Los efectos provocados fueron evaluados sobre: parámetros vegetativos, fotosintéticos y de producción. Los resultados indicaron que el estrés salino afectó a los rendimientos de todas las combinaciones de porta-injertos, ocurriendo en menor grado con 'Creonte' y 'Atlante', con unos porcentajes del 44,5 y 43,7 %, respectivamente, y encontrando que esta disminución se elevaba al 54,1 y 60 %, en los casos del auto injerto de la variedad y de ésta sin injertar.

**Palabras clave:** *Capsicum annuum*; salinidad; rendimiento; injerto.

## 1. INTRODUCCIÓN

El aumento de la salinidad y la degradación del suelo, junto con el agotamiento de los acuíferos, reducen la producción alcanzable, poniendo en riesgo la capacidad de los agricultores para satisfacer las brechas de producción y mejorar la seguridad alimentaria. Asegurar una producción adecuada de alimentos, es por tanto un tema importante en el contexto de una población humana cada vez mayor. Las zonas cultivables que presentan problemas de salinidad, se están incrementando debido al uso de aguas de mala calidad y al cambio climático. El continuo aumento de la población mundial, además, obliga a la expansión de los cultivos a tierras salinas no utilizadas anteriormente, para poder así mantener el suministro mundial de alimentos con lo que se están agravando aún más los problemas de salinidad ya existentes en el agua y en el suelo [1]. Este problema es de gran importancia en las zonas de la cuenca Mediterránea con una agricultura intensiva.

El término “salinidad” implica alta concentración de sales en el suelo y/o el agua, y el NaCl constituye la parte predominante de esta salinidad. El estrés salino, es uno de los más importantes estreses abióticos en regiones áridas y semiáridas [2,3] y tiene el mayor impacto en la reducción de la superficie de tierra cultivada. Es también uno de los principales factores medioambientales que limita el crecimiento de las plantas y la productividad de los cultivos [4, 5, 6]. Bajo estrés, las plantas tienen menos materia seca, área foliar [7] y producción, y se modifican sus características morfológicas [8].

De entre los cultivos vegetales que crecen en el área mediterránea, el pimiento es uno de los más importantes y se considera como sensible a la salinidad [9], aunque algunos autores consideran, que solo es sensible en ciertas etapas de crecimiento [10,11] o su respuesta depende del cultivar [12]. Existen pocos estudios sobre el efecto del injerto en plantas de pimiento bajo condiciones de salinidad, aunque diversos autores [13] han justificado el aumento del crecimiento y del rendimiento de fruta en plantas injertadas en condiciones de salinidad, especialmente en tomate [14], sandía [15], o berenjenas [16].

El objetivo del trabajo fue estudiar el efecto amortiguador que ejercen los porta-injertos en plantas de pimiento en invernadero frente a estrés salino.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal y condiciones del invernadero

Se evaluaron plantas de la variedad Gacela ‘F1’ (Syngenta Seeds, Holanda) injertadas sobre tres porta-injertos comerciales y sobre sí mismas: Atlante (Ramiro Arnedo, España), Creonte (De Ruiter Seeds, Holanda) y Terrano (Syngenta Seeds, Holanda). Plantas de Gacela sin injertar e injertadas sobre los mismos porta-injertos, se usaron como control. Las plántulas se trasplantaron individualmente el 22 de diciembre de 2015 a macetas de 10 l. que contenían una mezcla de 50 % arena, 30 % de turba y 20% de vermiculita. El tratamiento de salinidad se inició el 14 de marzo añadiendo NaCl (35 Mm) a la solución de riego para llegar a una CE de 5,5 mS.cm<sup>-1</sup>. La CE de la solución fertilizante en el tratamiento control fue de 1,8 mS.cm<sup>-1</sup>. El riego por goteo se suministró basado en estimaciones de la evapotranspiración del cultivo semanal (ETC). La solución salina se dejó drenar libremente en las macetas y el drenaje osciló entre el 10% y el 20%, dependiendo de la radiación solar. El ciclo de cultivo finalizó el 25 de julio de 2016.

### 2.2 Parámetros medidos

Al final del ciclo de cultivo (202 DDT), 15 plantas de cada tratamiento se usaron para medir diferentes parámetros vegetativos: altura de la planta y biomasa aérea. Se analizó el intercambio

de gases en hojas totalmente desarrolladas a los 142 DDT (días después del trasplante), de 9:00-11:00 am (GMT). La tasa fotosintética ( $A_{max}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2/\text{m}^2\text{s}$ ) se midió en condiciones constantes de saturación de luz ( $800 \text{ mmol}/\text{m}^2\text{s}$ ) y 400 ppm de  $\text{CO}_2$  con un medidor de fotosíntesis portátil LI-6400 (LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska, USA). Se midió el potencial hídrico ( $\Psi_H$ ), el cual se determinó con una cámara de presión (cámara Scholander) y la producción total la cual fue controlada en seis recolecciones.

### 2.3 Diseño del experimento

Plantas injertadas y sin injertar crecieron en una unidad modular de invernadero. El diseño experimental fue en bloques al azar. Cada tratamiento (material vegetal) tenía tres bloques y 8 plantas cada uno. El programa estadístico utilizado fue Statgraphics calculando las diferencias significativas por ANOVA y los resultados fueron comparados con una probabilidad de  $P \leq 0.05$  de acuerdo al test LSD.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La longitud de la planta se ha visto afectada por la salinidad [4,5] en plantas no injertadas en un 32,4 % (Tabla 1), sin embargo esta reducción es menor en plantas injertadas y siendo el injerto de Gacela sobre sí mismo el que presentó una menor reducción (alrededor de un 17%). Sin embargo la biomasa aérea aumenta en las plantas con sales en todos los casos, posiblemente promovida por una mayor lignificación en las estructuras de la planta.

Por lo que respecta a las relaciones hídricas e intercambio gaseoso (Tabla 1), se pudo observar que las plantas no injertadas presentan valores de potencial hídrico foliar ( $\Psi_H$ ) más altos que las injertadas, y que los valores más bajos se daban en la variedad injertada, sobre 'Atlante' y 'Terrano', tanto en condiciones de estrés o no, aunque sin diferencias significativas entre tratamientos. Se constató la disminución de la fotosíntesis bajo condiciones de estrés salino, siendo una de las alteraciones fisiológicas más observadas [20], debida principalmente a una limitación estomática. La actividad fotosintética presentó valores más altos en las plantas injertadas bajo ambas condiciones NS y S, y siendo 'Creonte' la que presentó unos mayores valores (Tabla 1).

Con respecto a la producción (Tabla 1), el rendimiento de las plantas en condiciones salinas se ve afectado con una menor producción, descendiendo en un 60 % en las plantas no injertadas; sin embargo en las plantas injertadas esta reducción fue menor, destacando las plantas realizadas sobre 'Creonte' y 'Atlante', en las que la producción disminuyó en un 44 % y 45 %, respectivamente. Esta menor reducción en la producción, podría estar relacionada con la capacidad de regulación del porta-injertos en el transporte del  $\text{Cl}^-$  hacia los órganos sumidero de los frutos. Similares resultados se han constatado para plantas injertadas de tomate [14], y de pimiento [17].

## 4. CONCLUSIONES

La sal disminuyó la producción, el crecimiento, la fotosíntesis, aumentó la biomasa foliar y no afectó al  $\Psi_H$ . Se produjo un incremento en el crecimiento en G-G, un aumento de la fotosíntesis en G-C y en cuanto a la producción, en todas las combinaciones de plantas injertadas tanto en el tratamiento control como en el tratamiento salino, se observó una mayor producción con respecto a la variedad sin injertar, por lo que el efecto no es en sí del porta-injertos sino del hecho de injertar. Y a pesar de las bondades del injerto, los diferentes parámetros estudiados se vieron afectados en condiciones de salinidad.

## 5. REFERENCIAS

- [1] Jensen, C.R., Ørum, J.E., Pedersen, S.M., Andersen, M.N., Plauborg, F., Liu, F., Jacobsen, S.E., 2014. A short overview of measures for securing water resources for irrigated crop production. *J. Agron. CropSci.* 200: 333-343.
- [2] Ashraf M. and Harris P.J.C. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant. Sci.* 166:16.
- [3] Hebbara M., Rajakumar G.R., Ravishankar G. and Raghavaiah C.V. 2003. Effect of salinity stress on seed yield through physiological parameters in sunflower genotypes. *Helia*26:155-160.
- [4] Chartzoulakis, K. and Klapaki, G. 2000. Response of two greenhouse pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages. *Sci. Hortic.* 86: 247–260.
- [5] Demir, I. and Mavi, K. 2008. Effect of salt and osmotic stresses on the germination of pepper seeds of different maturation stages. *BrazilianArch. Biol. Technol.* 51: 897–902.
- [6] Tuna, A.L., Kaya, C., Higgs, D., Murillo-Amador, B., Aydemir, S. and Girgin, A.R. 2008. Silicon improves salinity tolerance in wheat plants. *Environ. Exp. Bot.* 62:10–16.
- [7] Amirjani M.R. 2011. Effect of salinity stress on growth, sugar content, pigments and enzyme activity on rice. *Int. Bot.* 7:73-81.
- [8] Zadeh H.M. and Naeini M.B. 2007. Effects of salinity stress on the morphology and yield of two cultivars of canola (*Brassica napus* L.). *J. Agron.*6:409-414.
- [9] Kurunc, A., Unlukara, A., Cemek, B. 2011. Salinity and drought affect yield response of bell pepper similarly. *Acta Agric. Scand. Sect., B: Soil Plant. Sci.* 61: 514–522.
- [10] Bethke, P. C. and Drew, M. C. 1992. Stomatal and non stomatal components to inhibition of photosynthesis in leaves of *Capsicum annum* during progressive exposure to NaCl salinity. *Plant Physiol.* 99: 219–226.
- [11] De Pascale, E., Ruggiero, C., Barbieri, G., and Maggio, A. 2003. Physiological responses of pepper to salinity and drought. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*128: 48–54.
- [12] Niu, G., Rodriguez, D. S., Crosby, K., Leskovar, D. y Jifon, J. 2010. Rapid screening for relative salt tolerance among Chile pepper genotypes. *HortSci.* 45: 1192-1195.
- [13] Colla, G., Roupael, Y., Leonardi, C. and Bie, Z. 2010. Role of grafting in vegetable crops grown under saline conditions. *Sci. Hortic.* 127:147-155.
- [14] Estañ, M. T., Martínez-Rodríguez, M. M., Pérez-Alfocea, F., Flowers, T. J. y Bolarin, M. C. 2005. Grafting raises the salt tolerance of tomato through limiting the transport of sodium and chloride to the shoot. *J. Exp. Bot.* 56: 703-712.
- [15] Yetisir, H. y Uygur, U. 2010. Responses of grafted watermelon on to different gourd species to salinity stress. *J. PlantNutr.* 33: 315-327.
- [16] Wei, G. P., Zhu, Y. L., Liu, Z. L., Yang, L. F. y Zhang, G. W. 2007. Growth and ionic distribution of grafted eggplant seedling with NaCl stress. *Acta Bot. Boreal Occident Sin.* 27, 1172-1178.
- [17] Calatayud, A., Marsal, J.I., Lopez-Galarza, S., San Bautistas, A., Nebauer, S.G. 2011. Efecto del injerto sobre la respuesta a la salinidad de pimiento. *Actas de Horticultura.* 58:139-143.

**Tabla 1.** Parámetros vegetativos, hídricos, fotosintéticos y productivos de las plantas de pimiento con cada combinación de injerto y control, en estrés (S) y no estrés (NS).

Parámetros	TTO	G	G-G	G-C	G-A	G-T
<b>Longitud (cm)</b>	NS	84,33cB	74,33bB	68,00abB	67,33abB	66,00aB
	S	57,00aA	62,33bA	55,33aA	55,67aA	54,67aA
<b>Biomasa aérea</b>	NS	5,90bA	5,67abA	5,08aA	5,42abA	5,76abA
	S	6,13abB	6,06abB	5,31aB	5,68abB	6,35bB
<b>Ψh (MPa)</b>	NS	-0,94aA	-0,78aA	-0,64abA	-0,56bA	-0,52bA
	S	-1,11aA	-0,88bA	-0,69bA	-0,55±bA	-0,57bA
<b>A<sub>N</sub> (μmol CO<sub>2</sub>.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>)</b>	NS	12,86aB	13,46aB	16,21aB	14,33aB	14,02aB
	S	8,88aA	9,60aA	12,43aA	10,30aA	10,12aA
<b>Producción (Kg.planta<sup>-1</sup>)</b>	NS	1,10aB	1,36bB	1,34bB	1,26bB	1,29bB
	S	0,44aA	0,62bA	0,75bA	0,70bA	0,64bA

G: Gacela; G-G: Gacela-Gacela; G-C: Gacela-Creonte; G-A: Gacela-Atlante; G-T: Gacela-Terrano. Letras diferentes indican diferencias significativas, las minúsculas entre porta-injertos y las mayúsculas entre tratamientos (Test LSD, P<0,05).

## Rootstock modify the productive response of ‘Verna’ lemon under regulated deficit irrigation

### El portainjerto modifica la respuesta productiva del limonero ‘Verna’ en condiciones de riego deficitario controlado

J. M. Robles\*<sup>1</sup>, J.G. Pérez-Pérez<sup>1</sup>, P. Botía<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Recursos Naturales, Equipo de Riego y Fisiología del Estrés. Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), C/ Mayor s/n, La Alberca (Murcia), España.

\*juanm.robles@carm.es.

#### **Abstract**

The aim of this study was to evaluate the agronomic response of ‘Verna’ lemon trees grafted on two different vigour rootstocks on regulated deficit irrigation (RDC) conditions. The experiment was carried out during 3 consecutive years in the IMIDA experimental orchard, using 8-years-old trees of the variety ‘Verna’ lemon, grafted on *Citrus macrophylla* Wester (CM) and on sour orange (*Citrus aurantium* L.) (SO). There were two irrigation treatments: Control (100% ETc) and a RDC treatment, where trees were full irrigated (100% ETc) along the season unless in two fruit growth periods, F-I (phase I) and F-III (phase III) that irrigation was 25% ETc. The ‘Verna’ lemon trees grafted on CM showed better plant water status, greater vegetative growth and were more productive on full irrigation conditions. However, the less vigorous rootstock SO showed a better performance under RDC conditions, increasing water productivity and maintaining production and vegetative growth similar to Control treatment, so that SO could be recommended when water availability is not assured.

**Keywords:** Citrus trees; water relations; water productivity.

#### **Resumen**

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar la respuesta agronómica del limonero ‘Verna’ injertado sobre dos patrones con diferente vigor en condiciones de riego deficitario controlado (RDC). El ensayo se llevó a cabo durante tres años en una parcela experimental del IMIDA en árboles de 8 años de la variedad de limonero ‘Verna’ injertados sobre *Citrus macrophylla* Wester (CM) y naranjo amargo (*Citrus aurantium* L.) (SO). Se aplicaron dos tratamientos de riego, un tratamiento control (100 % ETc) y un tratamiento de RDC, regado al 100% ETc durante todo el año menos durante dos fases de desarrollo del fruto, F-I (fase I) y F-III (fase III), en las que la dosis de riego se redujo al 25% ETc. En condiciones óptimas de riego, los árboles injertados sobre CM mostraron un mejor estado hídrico, un mayor crecimiento vegetativo y fueron más productivos. Sin embargo, el portainjerto menos vigoroso (SO) presentó un mejor comportamiento en condiciones de RDC, manteniendo la producción y el crecimiento vegetativo similares al tratamiento Control además de aumentar la productividad del agua, por lo que podría ser recomendado cuando la disponibilidad de agua no esté asegurada.

**Palabras clave:** Cítricos; relaciones hídricas; productividad del agua.

## 1. INTRODUCCIÓN

En la Región de Murcia el cultivo del limonero supone más del 60 % de la producción cítrica regional. Esta región, posee un clima semiárido, caracterizado por un bajo régimen de lluvias y una elevada demanda evaporativa, que produce periodos de escasez de recursos hídricos, convirtiéndose en el principal factor limitante de la producción. La poca agua disponible para riego se puede optimizar aplicando diferentes estrategias de riego deficitario controlado (RDC), que consiste en reducir el riego durante los estadios fenológicos que menos afecten a la producción [1]. En España los patrones más utilizados para limonero son el naranjo amargo (*Citrus aurantium* L.) (SO) y el *Citrus macrophylla* Wester (CM). Los cultivares injertados sobre CM producen árboles grandes, vigorosos y con altos rendimientos, sin embargo, sobre SO los árboles son de vigor moderado y de tamaño medio a grande.

En estudios anteriores, se ha observado que las diferencias de vigor que existen entre patrones pueden inducir sobre la variedad injertada una respuesta diferente al déficit hídrico [2]. Las diferencias de vigor que existen entre ambos portainjertos podrían alterar las relaciones hídricas, crecimiento vegetativo y la producción de la variedad injertada 'Verna' en respuesta al déficit hídrico aplicado en condiciones semiáridas. Basándonos en estas premisas, el objetivo principal de este trabajo fue estudiar la respuesta del limonero 'Verna' injertado sobre CM y SO en condiciones de riego deficitario controlado.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se llevó a cabo durante 3 campañas en una parcela experimental del IMIDA, ubicada en el término municipal de Torre Pacheco, en árboles de 8 años de edad de la variedad de limonero 'Verna' clon 51, injertado sobre los patrones *Citrus macrophylla* Wester y naranjo amargo (*Citrus aurantium* L.), con un marco de plantación de 5 × 4 m. Se diseñó un sistema experimental bifactorial (2 patrones × 2 tratamientos) con 3 árboles controlados por bloque y 2 bloques por tratamiento. El sistema de riego consta de una línea portagoteros por fila de árboles, con 4 goteros de 4 L h<sup>-1</sup> por árbol. Se establecieron dos tratamientos de riego, un tratamiento control (100 % ETc; corregida en función de los valores de potencial hídrico de tallo a mediodía ( $\Psi_s$ ), manteniendo valores de  $\Psi_s$  superiores a -1,5 MPa durante las fases I y II de crecimiento del fruto y por encima de -1,2 MPa para el resto del ciclo de cultivo para mantener el tamaño comercial del fruto y evitar el exceso de calibre) y un tratamiento de riego deficitario controlado (RDC) al que se le redujo la dosis de riego al 25 % ETc en dos periodos de desarrollo del fruto, F-I (Fase I- división celular) y F-III (Fase III- maduración y cosecha). El  $\Psi_s$  se determinó con una cámara de presión. La poda se realizó anualmente en el mes de julio, al ser una variedad de recolección tardía y se pesó en fresco con una báscula digital la poda de cada árbol. La recolección se realizó en primavera, pesando y contando el total de frutos recolectados de cada árbol. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA), teniendo en cuenta los factores Tratamiento de riego y Patrón, con el paquete STATGRAPHICS CENTURION XV y la separación de medias se realizó mediante el test de rango múltiple de Duncan.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Siguiendo el criterio de programación del riego basado en umbrales de referencia del  $\Psi_s$ , la dosis de riego aplicada en los árboles control se redujo progresivamente. En el tercer año de ensayo se redujo en un 45% con respecto al primer año, sin alterar la producción, consiguiendo mantener la cosecha comercial más tiempo en el árbol. En el tratamiento RDC se redujo la cantidad de agua aplicada en un 20%, 32% y 39% respectivamente para cada uno de los años del ensayo.

En condiciones óptimas de riego (100% ETc) se observaron diferencias significativas en el estado hídrico entre patrones, mostrando los árboles de CM un mejor estado hídrico (-1,0 MPa) que los de SO (-1,12 MPa) a lo largo de las tres campañas del ensayo (Fig. 1). En estas condiciones, CM mostró un mayor desarrollo vegetativo que SO. De hecho, el peso de poda acumulado al final del ensayo fue un 28% menor en SO comparado con CM (Tabla 1) reflejando que el mayor vigor de CM indujo árboles más grandes que SO. Tras tres campañas de estudio, SO presentó una menor producción acumulada (36% menos) que CM, siendo la respuesta similar a la observada en árboles limonero 'Fino 49' cultivados bajo las mismas condiciones edafoclimáticas [3]. Además, la productividad del agua (WP) fue significativamente superior en árboles de CM.

Sin embargo, bajo condiciones de RDC, durante la fase I de 2008 y 2009 los árboles en SO alcanzaron valores de  $\Psi_s$  menores que los de CM, ( $\approx$  -2.0 MPa y -1.8 MPa en SO y CM, respectivamente) desarrollando los árboles de SO el estrés hídrico más rápido que CM ( $\approx$  0.026 MPa día<sup>-1</sup> y 0.019 MPa día<sup>-1</sup>) (Fig. 1). En fase III, previo a la presencia de lluvias, la respuesta fue similar, cuando hubo déficit hídrico (en 2010 valores de  $\approx$  -2.3 MPa y -1.7 MPa para SO y CM, respectivamente) con una tasa diaria de disminución del  $\Psi_s$  de 0.03 MPa día<sup>-1</sup> y 0.01 MPa día<sup>-1</sup> para SO y CM (Fig. 1). Durante ambos periodos de riego deficitario, los árboles de SO alcanzaron valores de  $\Psi_s$  más bajos y más rápidamente que en CM, lo que indica que el déficit hídrico aplicado afectó mucho más el estado hídrico de SO que el de CM. El tratamiento RDC afectó significativamente al crecimiento vegetativo mucho más en CM que en SO. Después de 3 años de ensayo el peso de poda en CM-RDC descendió un 34% mientras que en SO-RDC dicha reducción sólo fue de un 12%. Estos resultados indican que árboles de SO mostraron una mayor tolerancia al déficit hídrico, a pesar de que el tratamiento de RDC afectó mucho más al  $\Psi_s$ , que en árboles de CM. La aplicación del tratamiento RDC redujo la producción acumulada significativamente respecto al tratamiento control en CM (28 % menos), mientras que NA-RDC obtuvo valores similares al control (Tabla 1) durante los tres años del ensayo. El descenso de producción observado en CM-RDC fue debido principalmente por una disminución significativa en el número de frutos por árbol, causado posiblemente por el estrés hídrico sufrido durante F-I [4]. Respecto a la WP, después de tres años de ensayo, la aplicación del tratamiento RDC supuso una mejora significativa en SO pero no en CM (Tabla 1).

#### 4. CONCLUSIONES

El limonero 'Verna' injertado sobre CM mostró un mejor estado hídrico de la planta, mayor desarrollo vegetativo y fue mucho más productivo bajo condiciones óptimas de riego que SO. Sin embargo, en condiciones de RDC, SO mostró un mejor comportamiento, reduciendo el efecto del déficit hídrico en el desarrollo vegetativo y en la producción, por lo que SO podría ser recomendado para esta variedad en zonas con escasez de recursos hídricos.

#### 5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a M.I. García-Oller, J.M. Frutos, J.L. Lozano, E.M. Arques y V. Quinto por su ayuda tanto en el campo como en el laboratorio. Este trabajo fue financiado parcialmente por el proyecto POI07-12 y el contrato post-doctoral FIT a través de fondos FEDER-80%, con la colaboración del proyecto INIA RTA2012-00102-00-00.

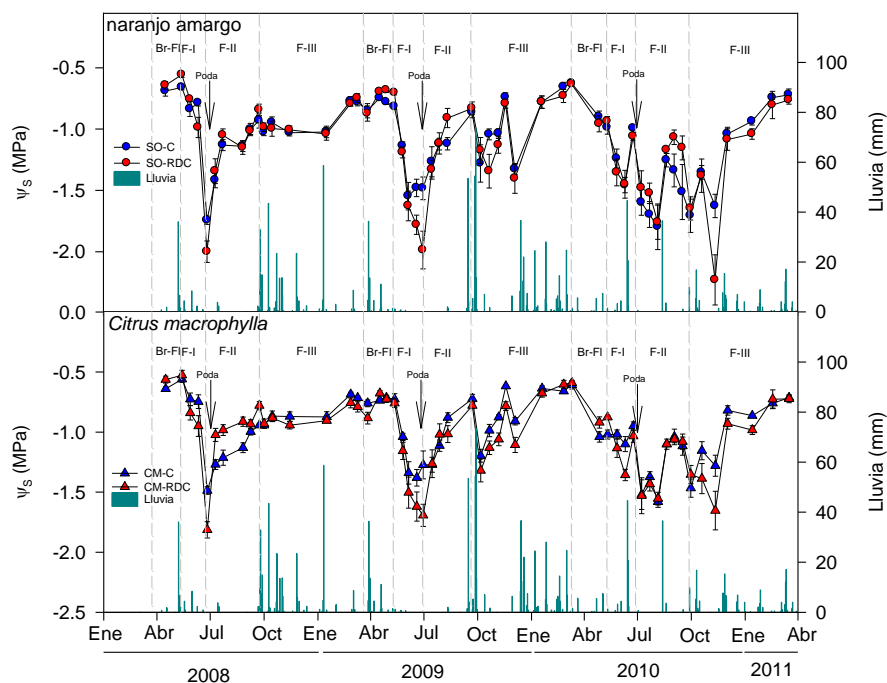
#### 6. REFERENCIAS

- [1] Mitchell P. D., Chalmers D. J., Jerie P. H. and Burge G. 1986. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 111: 858-861.
- [2] Pérez-Pérez J. G., Romero P., Navarro J.M., Botía P. 2008a. Response of sweet orange cv 'Lane late' to deficit irrigation in two rootstocks. I: water relations, leaf gas exchange and vegetative growth. Irrig. Sci. 26: 415- 425.



[3] Pérez-Pérez J. G., Porras I., García-Lidon A., Botía P., García-Sánchez F. 2005. Fino lemon clones compared with two other lemon varieties on two rootstocks in Murcia (Spain). *Sci. Hort.* 106: 530-538.

[4] Pérez-Pérez J. G., Romero P., Navarro J. M., Botía P. 2008b. Response of sweet orange cv 'Lane late' to deficit irrigation in two rootstocks. II: flowering, fruit growth, yield and fruit quality. *Irrig. Sci.* 26: 519-529.



**Figura 1.** Evolución estacional del potencial hídrico de tallo ( $\Psi_s$ ) para cada tratamiento de riego (C, control y RDC, riego deficitario controlado) y portainjerto (SO, naranjo amargo y CM, *Citrus macrophylla*) durante el periodo experimental (2008-2011).

**Tabla 1.** Parámetros productivos (producción acumulada, número de frutos acumulados y peso medio del fruto), peso fresco de la poda acumulada y productividad del uso del agua (WP) para cada tratamiento de riego (C, control y RDC, riego deficitario controlado) y portainjerto (SO, naranjo amargo y CM, *Citrus macrophylla*) durante el periodo experimental (2008-2011).

2008-2011	Producción acumulada (kg árbol <sup>-1</sup> )	Carga productiva (nº frutos árbol <sup>-1</sup> )	Peso medio de fruto (g)	Peso fresco poda (kg árbol <sup>-1</sup> )	WP (Kg m <sup>-3</sup> )
SO-C	266.3 b	1679 b	170	74.5 b	12.2 b
SO-RDI	290.6 b	1880 b	163	65.5 b	20.3 a
CM-C	415.8 a	2344 a	181	103.4 a	19.4 a
CM-RDI	299.0 b	1884 b	169	68.3 b	21.3 a
<b>ANOVA</b>					
Patrón	**	*	ns	*	*
Tratamiento	ns	ns	*	**	**
P×T	**	*	ns	*	*

'ns' no significativo; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ . Dentro de cada columna, diferentes letras indican diferencias significativas a  $P \leq 0.05$  según el test de Duncan. (n = 6).



# ORAL SESSION IV:

## Agrifood Biotechnology

## Analysis of growth kinetics of *Petunia sp.* using a computer vision based phenotyping system

## Análisis de la cinética de crecimiento de *Petunia sp.* mediante un sistema de fenotipado basado en visión artificial

F. Pérez-Sanz<sup>1\*</sup>, J. Weiss<sup>1</sup>, P.J. Navarro-Lorente<sup>2</sup>, M. Egea-Cortines<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genética, Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, Cartagena 30202, España.

<sup>2</sup>DSIE, Universidad Politécnica de Cartagena, Campus Muralla del Mar, s/n. Cartagena 30202, España.

\*fernando.perez8@um.es

### **Abstract**

high throughput phenotyping in plants, is a major challenge to improve our understanding of how these biological systems work and to improve crop yields. Phenotyping systems are tools that can help improve our understanding in this field. In this work, we show the development of a system of computer vision based phenotyping system applied to the study of growth in *Petunia*'s flowers, showing its robustness and flexibility. As a result, it has been observed that, at the reproductive tissue level and based on the data analyzed, there are no significant differences in the growth rate of the *Petunia* flower.

**Keywords:** Circadian clock; plant phenotyping; computer vision.

### **Resumen**

El fenotipado masivo de plantas es un importante reto para tanto para mejorar nuestra comprensión sobre el funcionamiento de estos sistemas biológicos como para la mejora del rendimiento de los cultivos. Los sistemas de fenotipado son herramientas que pueden ayudar a mejorar nuestra comprensión en este campo. En este trabajo mostramos el desarrollo de un sistema de fenotipado basado en visión artificial aplicado al estudio del crecimiento en flores de *Petunia*, mostrando su robustez y flexibilidad. Se ha podido observar que, a nivel de tejido reproductivo y en base a los datos analizados, no se observan diferencias significativas en la velocidad de crecimiento de la flor de *Petunia*.

**Palabras clave:** Reloj circadiano; fenotipado de plantas; visión artificial.

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde mucho antes de que se descubriese el DNA los agricultores ya hacían selección vegetal basada en fenotipos. Sin embargo, este proceso, aunque eficaz es lento. Hoy con la creciente demanda de alimentos a nivel mundial, se hace indispensable tener la capacidad de fenotipar y seleccionar con mayor rapidez y eficacia.

Por ello en los últimos años, la industria alimentaria junto con avanzados institutos de investigación como el Australian *Plant Phenomics Facility* (<http://www.plantphenomics.org.au/>), el *European Plant Phenotyping Network* (<http://www.plant-phenotyping-network.eu/>) o la *USDA* (<http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>) entre otros están colaborando en el

desarrollo de plataformas de fenotipado, que faciliten el procesado de la ingente cantidad de información genética aportada por las actuales técnicas de genotipado de alto rendimiento (HTS). Además estas plataformas se emplean tanto para contrastar si el espécimen se comporta fenotípicamente tal como se espera por su genotipo [1, 2] como para ayudar a comprender determinados procesos o comportamientos biológicos.

La llegada de las llamadas tecnologías ómicas, ha supuesto un enorme cambio en la forma en el diseño experimental abriendo nuevas vías de conocimiento dentro del campo de la biología [3]. Una de las más recientes en aparecer dentro del campo del muestreo automático y masivo ha sido la fenómica, que comprende el conjunto de herramientas que ayudan a adquirir datos fenotípicos cuantitativos. Dentro de este grupo de herramientas, una de las más actuales se basa en la adquisición automática de imágenes basada en sistemas de visión artificial [4].

El reloj circadiano está constituido por una compleja red de genes presentes en la mayor parte de los organismos de la Tierra, que regula y les permite anticiparse y adaptarse de forma eficaz a los cambios cíclicos día/noche [5]. La sincronización de estos componentes del reloj con señales externas refuerza el funcionamiento rítmico del reloj, regulando procesos tales como la fotosíntesis, floración, niveles hormonales, etc. [6].

En este trabajo hemos desarrollado un sistema de fenotipado basado en visión artificial, flexible y robusto con el que se pretende estudiar la cinética del desarrollo de algunos órganos de la planta de forma no invasiva ni destructiva [7]. Se pretende determinar si existe en todos los casos, una relación directa entre el crecimiento y los ciclos día/noche entre individuos silvestres y transgénicos, con el fin de aportar algo más de conocimientos acerca del comportamiento fenotípico de mutantes del reloj.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2 Material biológico

Se han empleado ejemplares de dos líneas de *Petunia x hybrida*, una azigota no transgénica y otra que expresa una construcción de RNAi cuya función es silenciar el gen PhZTL. En la grabación se han medido dos flores PhZTL y una *wild type* (WT)

El sistema de adquisición (Fig. 1a y 1b) de datos está formado por 4 módulos descritos a continuación.

### 2.2 Subsistema de iluminación

El panel diurno está constituido por una combinación de cinco tipos de diodos de emisión de luz (LED) de diferentes longitudes de onda (UV-290, 450, 460, 630 y 660 nm), diseñado para favorecer el crecimiento de la planta (Fig. 1a).

El panel nocturno está compuesto por una barra de 132 LEDs que emiten en el infrarrojo cercano (850 nm), esta luz es activada durante 2-3 segundos, tiempo suficiente para disparar la cámara de visión (Fig. 1a).

Mediante esta combinación de luminarias se realizó un experimento luz/oscuridad de 14h./10h., periodo que se asemeja al que tenían las plantas cuando se cogieron del invernadero.

### 2.3 Subsistema de captura

Se ha empleado una cámara de visión artificial multispectral, que consta de dos sensores de dispositivo de carga acoplada (CCD). Uno es multicanal RGB de 24 bits que captura imágenes en espectro visible (para los ciclos diurnos) y otro monocanal, capaz de captar en el infrarrojo. Ambos con resolución de 1296 (h) x 966 (v) píxeles y comunicación Gigabyte Ethernet.

Tanto el sistema de captura como de iluminación están controlados mediante una interfaz gráfica de usuario de diseño propio y desarrollada en C/C++. A través de una tarjeta electrónica digital con 8 canales de entrada/salida y una tarjeta de relés optoacoplados. Un PC-industrial es el encargado de controlar todos los parámetros del sistema a través del puerto USB el sistema de iluminación y de dos puertos ethernet la cámara de visión.

#### 2.4 Subsistema de procesado y análisis

Para el análisis de imágenes se ha empleado el paquete comercial Matrox Imaging Library ([MIL](#)). Es una aplicación orientada al análisis de imágenes médicas, visión artificial, análisis de vídeo, etc. Las librerías están disponibles para programar en C++, VisualBasic y VisualC++, alternativamente proporcionan una interfaz gráfica para el análisis y permite automatizar trabajos mediante *scripts* dentro de la propia interfaz.

El análisis estadístico de los resultados se ha realizado mediante el lenguaje de programación estadística [R](#).

Se ha realizado un ciclo de grabación de 146 horas aproximadamente hasta la apertura de las flores, obteniendo un total de 584 imágenes capturadas a intervalos de 15 minutos. Los parámetros que se han medido sobre la flor de Petunia, han sido la longitud a lo largo del eje longitudinal de la flor, área el centro de gravedad y el ángulo respecto a la horizontal.

A partir de ellos se han obtenido otros parámetros calculados como la tasa de crecimiento, definida como incremento de longitud por unidad de tiempo, o el vector de movimiento definido como la distancia del centro de gravedad en cada periodo respecto al periodo inicial.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El sistema ha sido empleado para la realización de diversos test y experimentos, habiendo estado en funcionamiento ininterrumpido durante varias semanas, mostrando su robustez y flexibilidad.

Tras realizar test de Welch o ANOVA heterocedástica, para contrastar si existen diferencias significativas en cuanto a velocidad de crecimiento, no se han observado diferencias estadísticamente significativas. De la observación de las gráficas de variación de ángulo y vector de movimiento se desprende el paralelismo existente entre las curvas de cada individuo, algo que se evidencia especialmente en la gráfica del vector de movimiento (Fig. 2a y 2b). Como resultado de un análisis de series temporales de un WT con un ZTL, se ha podido observar un ligero desfase en el movimiento de las flores a favor de ZTL.

### 4. CONCLUSIONES

Los experimentos previos realizados en invernadero muestran diferencias fenotípicas importantes a nivel de crecimiento vegetativo y tiempo de floración, sin embargo, esas diferencias no se reflejan de forma significativa en la velocidad crecimiento y movimiento de la flor. Por tanto, debe existir una diferenciación a nivel de las señales por parte del reloj circadiano que difiera entre el tejido vegetativo y el reproductivo. El hecho de encontrar un pequeño desfase al analizar series temporales podría indicar que el silenciamiento de ZTL podría estar afectando a la sincronización del individuo con los ciclos día/noche. Pensamos, sin embargo, que es necesario realizar más experimentos con distintas líneas transgénicas con el fin de validar estas conclusiones preliminares.

## 5. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis directores de tesis su interés, dedicación, consejos y críticas (siempre constructivas).

El trabajo realizado se enmarca dentro de los proyectos MICINN BFU-2013-45148-R y ViSel-TR (TIN2012-39279).

## 6. REFERENCIAS

- [1] Fiorani, F., Schurr, U. 2013. Future scenarios for plant phenotyping. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64:267–91.
- [2] Weight, C., Parnham, D., Waites, R. 2008. LeafAnalyser: A computational method for rapid and large-scale analyses of leaf shape variation. *Plant J.* 53:578–586.
- [3] Fahlgren, N., Gehan, M. a, Baxter, I. 2015. Lights, camera, action: high-throughput plant phenotyping is ready for a close-up. *Curr. Opin. Plant Biol.* 24:93–99.
- [4] Deligiannidis, L., Arabnia, H., Emerging Trends in Image Processing, Computer Vision and Pattern Recognition, 1st ed., Morgan Kaufmann, Waltham, USA 2014.
- [5] Staiger, D., Shin, J., Johansson, M., Davis, S.J., 2013. The circadian clock goes genomic. *Genome Biol.* 14:208.
- [6] Nagel, D.H., Pruneda-Paz, J.L., Kay, S. a. 2014. FBH1 affects warm temperature responses in the Arabidopsis circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111:14595–14600.
- [7] Navarro, P.J., Pérez, F., Weiss, J., Egea-Cortines, M. 2016. Machine Learning and Computer Vision System for Phenotype Data Acquisition and Analysis in Plants. *Sensors (Basel).* 16:641.



Figura 1. Configuración grabación cenital.

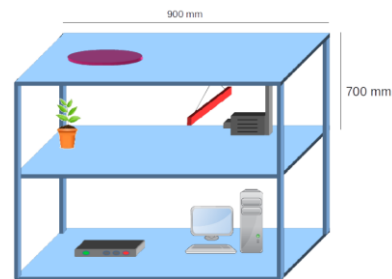


Figura 2. Esquema del sistema.

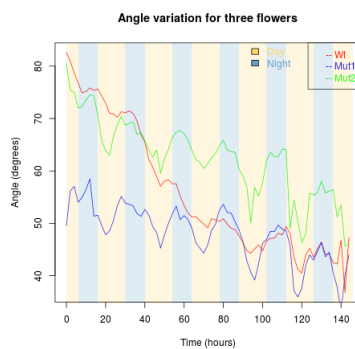


Figura 3. Variación del ángulo en el tiempo.

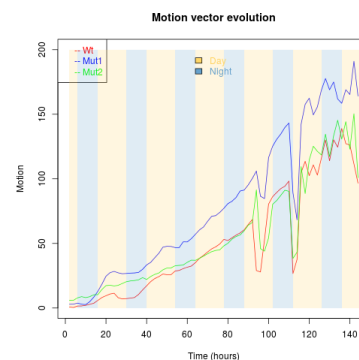


Figura 4. Variación del vector movimiento.

# Structure of the leaf and petal circadian clock in petunia

## Estructura del reloj circadiano en hoja y pétalo de petunia

M.I. Terry<sup>1\*</sup>, M. Egea<sup>1</sup>, J. Weiss<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genética Molecular, Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, 30202 Cartagena, España.

\*mitl0@upct.alu.es

### **Abstract**

**Organisms from bacteria to humans are subject to periodic oscillations as consequence of terrestrial rotation; the existence of biological clocks allow organisms to anticipate to daily changes. In plants, the circadian clock has been studied only in leaf so there is not much information about its adaptation in other tissues. In the current work, clock genes have been identified and analyzed in petunia leaf and petal, where, among others, changes in expression between both tissues have been observed, suggesting a tissue or organ specific specialization.**

**Keywords:** Biological rhythm; Petunia x hybrida; Solanaceae; qPCR

### **Resumen**

**Los seres vivos, desde bacterias hasta el ser humano, están sujetos a oscilaciones periódicas como consecuencia de la rotación terrestre; la existencia de los relojes biológicos permite a los organismos anticiparse a estos cambios diarios. En plantas, el reloj circadiano ha sido el más estudiado, especialmente en hoja, por lo que no existe mucha información sobre esta adaptación en otros tejidos. En el presente trabajo se han identificado y caracterizado genes del reloj en pétalo y hoja de petunia, donde se ha observado entre otros, cambios a nivel de expresión entre ambos tejidos, lo que sugiere una especialización tejido u órgano específico.**

**Palabras clave:** Petunia x hybrida; Ritmo biológico; Solanácea; qPCR

## **1. INTRODUCCIÓN**

Los organismos están sujetos a oscilaciones periódicas como consecuencia de la rotación del planeta; y son capaces de anticiparse a esta alternancia del día y la noche. Los relojes biológicos son los responsables de esta adaptación al medio oscilante pero cíclico. De ellos el reloj circadiano, referido a ciclos con una duración de entre 20 y 28 horas, ha sido el más ampliamente estudiado. Este reloj circadiano consta de una serie de bucles interconectados y las plantas no son una excepción. En el modelo *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), sobre el que se han desarrollado la mayor parte de estos estudios, se han descrito tres bucles formados por diversos genes entre los que cabe destacar *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)*, *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* y la familia *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR (PRRs)* que incluye el gen *TIMING OF CAB EXPRESSION (TOC1)* [1]; además otros genes como *ZEITLUPE (ZTL)*, un receptor de luz azul, y *GIGANTEA (GI)* juegan un papel importante en el reloj.

Aunque se conocen muchas de las piezas que conforman este reloj, el papel de éstas en la regulación de diversos procesos biológicos como el crecimiento y el metabolismo, no es bien conocido. Por otro lado, los estudios anteriormente mencionados se realizaron mayoritariamente

en hoja por lo que este reloj no se conoce bien en otros tejidos y órganos, tales como flores o raíces. En el presente trabajo se empleará la planta modelo petunia (*Petunia x hybrida*).

Petunia pertenece a la familia de las solanáceas, donde se incluyen especies de gran importancia en producción, como el tomate o la patata, y posee un gran interés en horticultura y en investigación. Recientemente su genoma ha sido secuenciado [2] y al igual que otras plantas de la familia, es diploide pero posee una serie de duplicaciones ancestrales del genoma. Además difiere del resto de solanáceas al presentar siete cromosomas frente a doce que presentan tomate o patata..

Este trabajo tiene como objetivos principales identificar, caracterizar y establecer patrones de expresión de los principales genes del reloj en dos tejidos distintos de petunia: hoja y flor.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

Las petunias, Mitchell o W115, se germinaron en cámaras de cultivo con condiciones controladas: 16 horas de luz y 8 de oscuridad (o 16L:8D) y 23 y 18 °C durante el día y la noche, respectivamente. Posteriormente, las plantas se llevaron a los invernaderos de la Estación Experimental Agroalimentaria Tomás Ferro. Finalmente, previo al inicio del experimento, las plantas se trasladaron a una cámara de cultivo, esta vez bajo 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (12L:12D) con las mismas temperaturas citadas anteriormente y se aclimataron durante una semana. Transcurrido este tiempo, se recogieron a intervalos regulares hojas jóvenes (2-2,5 cm de longitud) y flores de tres días tras la apertura o postantesis de tres plantas distintas; estas muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior análisis.

### 2.2 Extracción de ARN, síntesis de ADNc y qPCR

La extracción de ARN (ácido ribonucleico) se realizó siguiendo el protocolo descrito por [3]. Para la síntesis de ADNc (ácido desoxirribonucleico complementario o copia), se siguió el protocolo especificado por el fabricante (ThermoFisher). Finalmente, la PCR a tiempo real o cuantitativa (*qPCR*) se realizó con el termociclador Mx3000P (Agilent Technologies) siguiendo las especificaciones del fabricante (Clontech) con las siguientes condiciones: 40 ciclos, 95 °C 15", 60 °C 20" y 72 °C 15", tomando *UBIQUITIN (UBI)* como gen de referencia o endógeno. Las secuencias de los cebadores de los genes analizados se recogen en la Tabla 1.

### 2.3 Análisis de datos

Para la detección de ritmos empleamos el paquete RAIN [4], desarrollado en Bioconductor.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los relojes biológicos han sido estudiados en profundidad en pocas plantas, destacando *Arabidopsis*; sin embargo, en los últimos años se han incrementado los trabajos realizados en otras especies, lo que está contribuyendo a mejorar aspectos como la producción y a entender las respuestas de las comunidades vegetales al cambio climático [5].

El reloj descrito en *Arabidopsis* difiere en varios aspectos del reloj de petunia. Primero, los genes *PRR7*, *PRR5* y *GI* están duplicados en petunia, (*PaxiN*): *PaxiNPRR7a*, *PaxiNPRR7b*, *PaxiNPRR5a*, *PaxiNPRR5b*, *PaxiNGI1* y *PaxiNGI2*, el árbol de la familia *PRRs* se recoge en la Fig. 1; además tres de estos genes duplicados mostraron un patrón distinto: el pico de *PaxiNPRR5a*, *PaxiNGI1* y *PaxiNGI2* tuvo lugar a distinta hora en pétalo y hoja. Estas diferencias no solo se observaron en los genes duplicados: *PaxiNPRR9* y *PaxiNFKF* también presentaron máximos en



momentos distintos del día (Fig. 1B, 1C). Por otro lado, aunque la expresión de los genes en hoja de petunia fue similar a la descrita en *Arabidopsis* [1, 6] (Fig. 1A, C); los patrones de expresión en pétalo son los que más difieren, tanto de *Arabidopsis* como de la hoja de petunia (Fig. 1). Finalmente, todos los genes excepto *PaxiNZTL* en hoja, mostraron una expresión rítmica; esto concuerda con lo descrito para el gen *ZTL* [7] que se expresa de manera constitutiva; sin embargo, la expresión en pétalo osciló significativamente ( $p = 2,22e^{-04}$ ). La existencia de relojes periféricos, además de un reloj central, es bien conocida en mamíferos; estudios sugieren que las plantas también presentan relojes específicos en diferentes tejidos, es decir, que la expresión de los genes que conforman el reloj varía entre tejidos [8]. Nuestros datos sugieren una especialización tejido u órgano específica del reloj.

#### 4. CONCLUSIONES

El reloj biológico consta de una serie de genes que regula el desarrollo de los organismos en respuesta al medio. Tanto en animales como en plantas existen estudios que apuntan a una especialización del reloj a nivel de tejido u órgano; los patrones de expresión obtenidos en el presente trabajo en pétalo y hoja de petunia, sumado a la duplicación de algunos de los genes involucrados en el reloj, sugieren que éste puede desempeñar un papel específico en cada tejido.

#### 5. AGRADECIMIENTOS

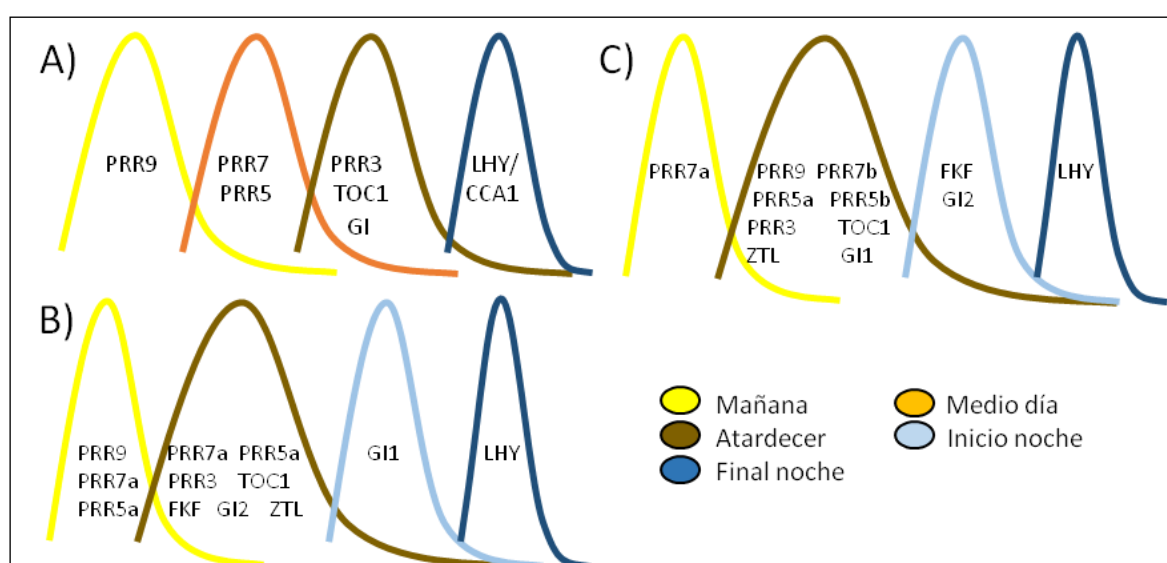
Este trabajo ha sido desarrollado bajo los proyectos Fundación Séneca 19398/PI/14 y BFU-2013-45148-R.

#### 6. REFERENCIAS

- [1] McClung C.R. 2014. Wheels within wheels: new transcriptional feedback loops in the *Arabidopsis* circadian clock. *F1000Prime Rep.* 6(2): 10-12703.
- [2] Bombarely A., Moser M., Amrad A., Bao M., Bapaume L., Barry C.S., ..., Bucher M. 2016. Insight into the evolution of the Solanaceae from the parental genomes of *Petunia hybrida*. *Nature Plants.* 2: 16074.
- [3] 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.
- [4] Thaben P.F., Westermark P.O. 2014. Detecting rhythms in time series with RAIN. *J. Biol. Rhythm.* 29 (6): 391-400.
- [5] McClung C.R. 2013. Beyond *Arabidopsis*: the circadian clock in non-model plant species. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 24(5): 430-436.
- [6] Fogelmark K., Troein C. 2014. Rethinking transcriptional activation in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plos. Comput. Biol.* 10(7): e1003705.
- [7] Kim W.Y., Geng R., Somers, D.E. 2003. Circadian phase-specific degradation of the F-box protein ZTL is mediated by the proteasome. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(8): 4933-4938.
- [8] Thain S.C., Murtas G., Lynn J.R., McGrath R.B., Millar A.J. 2002. The circadian clock that controls gene expression in *Arabidopsis* is tissue specific. *Plant. Physiol.* 130(1): 102-110.



**Figura 1.** Árbol filogenético de los genes *PRRs* de arábidopsis (At) y petunia (PaxiN)



**Figura 2.** Abundancia de los transcritos de los genes reloj a lo largo del día, representados por distintos colores (ver leyenda). A) Arabidopsis (hoja), B) Petunia (pétalo), C) Petunia (hoja)

**Tabla 1.** Cebadores (5' → 3') de petunia (PaxiN)

Gen	Sentido	Antisentido
PaxiNFKF	CTGGGCAACCTCCAAAAGTT	CATGGATCAGAATCTTGTTTGCT
PaxiNGI1	TGGAGAAAGGGCAGAGACAT	GTGGAGCCACCCTTACGTT
PaxiNGI2	TTAGAGTCCTTCACTCATCCATC	AATACAGCATTTGTTACATGGAGGT
PaxiNLHY	CGACGTGGTAGGAATTGCATC	GCAAGAAATGGTCATCAAAGGAC
PaxiNPRR3	GTGGAAGTGGTGATCGCTCT	TCCATCCTGACGCACAAAT
PaxiNPRR5a	CCAATGATGCCCATCTTCAT	ACGCTGCTCTGCAAGTTGTT
PaxiNPRR5b	GGAATCCCATCGATCTCAA	GGAGCCTCACTAGGTAATTGACC
PaxiNPRR7a	CAGAAGAGGAAGGAGCGATG	AGGAAAAGTAGGAAGGAAAGCA
PaxiNPRR7b	AGGTGCAAAATGCGGAAAGT	AGCATCTATCTTTCTTCTTGACG
PaxiNPRR9	GAGCTCATGTTCCGAGAGC	GGTCGCTGTTCTGCAAGTCT
PaxiNTOC1	TGATGGTAAGGGGAGCAAAG	CTGAAGCAGGATGCCATTA
PaxiNUBQ	TGGAGGATGGAAGGACTTTGG	CAGGACGACAACAAGCAACAG
PaxiNZTL	TGCATCTGTTGGCTCTGTTT	CCCCAACCAATCTCTTAGC

## Peach breeding (*Prunus persica* L.): Agronomic evaluation of selections IMIDA – NOVAMED: Siroco 30<sup>®</sup>, Siroco 40<sup>®</sup> y Siroco 43<sup>®</sup>

## Mejora genética de Melocotonero (*Prunus persica* L.): Evaluación agronómica de selecciones IMIDA-NOVAMED: Siroco 30<sup>®</sup>, Siroco 40<sup>®</sup> y Siroco 43<sup>®</sup>

A. Guevara<sup>1\*</sup>, A. Carrillo<sup>1</sup>, F. García<sup>1</sup>, D. López<sup>1</sup>, M.B. Lopez<sup>1</sup>, J. Cos<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA)

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

\*alfonso.guevara@carm.es

### **Abstract**

Nowadays, Spain is the second peach producing country and the first exporting country in the world. The flat peach occupies 25% of the total peach area cultivated in Spain. The IMIDA-NOVAMED breeding program has developed three new selections of flat peach, Siroco 30<sup>®</sup>, Siroco 40<sup>®</sup> and Siroco 43<sup>®</sup> that differ in harvest date and they show a very similar typology with a very high over color of skin, highlighting its organoleptic characteristic of low Acidity, high ° Brix and high firmness of the flesh, which make these selections very attractive for the consumer. With the aim of developing a varieties set with the same typology able to be supplied continuously in the sales line.

**Keywords:** Flat peach; typology; acidity; firmness; organoleptic quality.

### **Resumen**

A día de hoy España es el segundo país productor de melocotón y primer país exportador a nivel mundial. El paraguayo o melocotón de forma plana ocupa el 25% del total de la superficie cultivada en España. El programa de mejora IMIDA-NOVAMED ha desarrollado tres selecciones de paraguayo, Siroco 30<sup>®</sup>, Siroco 40<sup>®</sup> y Siroco 43<sup>®</sup> que difieren en fechas de recolección y presentan una tipología muy similar aportando una sobrecoloración del fruto o chapa muy alta, destacando sus características organolépticas de baja acidez, elevados °Brix y alta consistencia, lo que hace a estas selecciones una fruta muy atractiva para el consumidor. Con el objetivo de desarrollar una serie de variedades con la misma tipología para poder ser suministradas en los lineales de venta de forma continua.

**Palabras clave:** Paraguayo; tipología; acidez; firmeza; calidad organoléptica.

## **1. INTRODUCCIÓN**

En los últimos años se ha producido una gran revolución varietal en el cultivo del melocotón, con un gran incremento de superficie de formas planas, llegando a alcanzar el 25% de la superficie nacional de este cultivo. Esto es debido en buena parte, a la buena aceptación que ha tenido esta tipología por parte del consumidor, ya que las variedades cultivadas son de elevado contenido en azúcar, baja acidez y buena consistencia.

Los objetivos del programa de mejora genética de melocotón IMIDA-NOVAMED son básicamente la adaptación a las condiciones edafoclimáticas de las zonas de cultivo de la Región de Murcia, maduración precoz con una alta productividad y una buena calidad organoléptica aplicados a todas las tipologías de melocotón: melocotón rojo y amarillo, nectarina, y las formas planas [1].

Los objetivos de este trabajo son el estudio agronómico, caracterización en campo, análisis de laboratorio y estudio de las necesidades de frío, de las selecciones del programa de mejora genética IMIDA-NOVAMED: Siroco 30®, Siroco 40® y Siroco 43®.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Las selecciones a estudio se encuentran ubicadas en la finca de Novamed en la Hoya del Campo, Abarán (Murcia) con una superficie de 8 hectáreas y una media de 500 horas frío < 7°C. Las selecciones están en la misma parcela que la colección de variedades comerciales en un marco de plantación de 4x4m sobre patrón Garnem (*GxN 15*), la finca cuenta con estación meteorológica perteneciente a la red de estaciones del SIAM. Para la correcta valoración de las selecciones y su posterior solicitud de Obtención Vegetal, se han estudiado los caracteres que se recogen en la tabla de caracteres de melocotón de la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV).

### 2.1 Caracterización en campo.

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

### 2.2 Caracterización en laboratorio.

Muestra de 25 frutos para caracterizar teniendo en cuenta sobrecoloración o chapa del fruto, diámetro ecuatorial y longitudinal de los frutos mediante el calibre electrónico MITUTUYO, para caracterizar la pulpa de las variedades estudiadas se determinó la firmeza de la carne mediante un penetrómetro digital PENEFEL, usando un vástago cilíndrico de 8 mm de diámetro, expresando los datos en kg/cm<sup>2</sup>. Para la determinación del contenido en sólidos solubles (°Brix) y acidez se preparó una muestra de zumo de los 25 frutos. La medida de °Brix se realizó con el refractómetro digital Atago, realizando tres repeticiones de cada una de las muestras. La acidez se determinó con el valorador automático Metrohm, a partir de una muestra de 10 ml de zumo valorado con NaOH 0,1 N.

### 2.3. Estudio de necesidades de frío y calor.

Para cuantificar la adaptación de las variedades a una determinada zona de cultivo se calcularon las necesidades de frío de cada variedad siguiendo la metodología descrita por el equipo de mejora genética de *prunus* del CEBAS-CSIC [2] usando los siguientes modelos: horas bajo 7 °C (HF) [3], unidades de frío (UF) según el modelo de Utah [4] y modelo dinámico o de porciones [5].

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el trabajo se ha desarrollado una serie de paraguayos con la misma tipología para poder suministrar a los supermercados de forma continua y así el consumidor poder encontrarse durante largos periodos de tiempo fruta de similares características en los lineales de venta.

Siroco 30<sup>®</sup> se caracteriza por ser un paraguayo rojo de carne blanca con una floración entre la 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup> semana de febrero, la recolección viene dada entre la 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> semana de Mayo (Tabla 2). Con una sobrecoloración muy alta, baja acidez acompañada de un alto contenido en azúcar y aromas lo que le hace tener una alta calidad gustativa (Tabla 3). Tiene unas necesidades de frío medias de 31 porciones (Tabla 1). Siroco 30<sup>®</sup> se recolecta unos 6 días antes que UFO 3<sup>®</sup>, variedad comercial de referencia y posee mayor porcentaje de sobrecoloración, mayor tamaño y calidad gustativa.

Siroco 40<sup>®</sup> destaca por ser un paraguayo rojo de carne blanca con una floración entre la 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup> semana de febrero, la recolección viene dada entre la 1<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup> semana de Junio (Tabla 2). Con una sobrecoloración muy alta, baja acidez acompañada de un alto contenido en azúcar y aromas (Tabla 3). Tiene unas necesidades de frío medias de 30 porciones (Tabla 1). Siroco 40<sup>®</sup> de características muy similares a Siroco 30<sup>®</sup> se recolecta entre una y dos semanas después, si la comparamos con las variedades de referencia se encontraría en el momento de recolección de UFO 4<sup>®</sup> con menos necesidades de frío y mejorándola en calidades organolépticas.

Siroco 43<sup>®</sup> es un paraguayo rojo de carne blanca con una floración entre la 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> semana de febrero, la recolección viene dada para la 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup> semana de Junio (Tabla 2). Con una sobrecoloración muy alta, baja acidez acompañada de un alto contenido en azúcar y aromas (Tabla 3). Tiene unas necesidades de frío medias de 36 porciones (Tabla 1). Es un paraguayo de características muy similares a Siroco 30<sup>®</sup> y Siroco 40<sup>®</sup>, recolectándose unos días después que Siroco 40<sup>®</sup> y la variedad de referencia UFO 4<sup>®</sup>.

#### 4. CONCLUSIONES

Las selecciones de paraguayos rojos de carne blanca de IMIDA-NOVAMED caracterizados presentan como características destacadas su sobrecoloración roja oscura por toda la superficie del fruto, elevada consistencia, baja acidez y alto contenido en azúcar siendo una fruta muy atractiva para el consumidor.

Estas selecciones presentan mejores cualidades organolépticas y menos necesidades de frío que las variedades de referencia UFO 3<sup>®</sup> y UFO 4<sup>®</sup>.

Siroco 30<sup>®</sup>, Siroco 40<sup>®</sup> y Siroco 43<sup>®</sup> difieren en la fecha de maduración, ofreciendo un largo periodo de recolección y comercialización.

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

#### 5. AGRADECIMIENTOS

Fondos Feder 1420-05.

#### 6. REFERENCIAS

- [1] Guevara, A. García, F. Carrillo, A. López, D. López, M. Cos, J. 2016. Mejora genética de frutales de hueso en el Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario. Horticultura. Interempresas.net HC326, Pp.36-40.
- [2] Ruiz D, Campoy JA, Egea J. (2007). Chilling and heat requirements of apricot cultivars for flowering. *Environmental and Experimental Botany* 61(3), 254-263.
- [3] Weinberger JH. (1950). Chilling requirements of peach varieties. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 56(DEC), 122-128.
- [4] Richardson EA, Seeley SD, Walker DR. (1974). A model for estimating the completion of rest for "Redhaven" and "Elberta" peach trees. *HortScience*. p. 331-332.
- [5] Fishman S, Erez A, Couvillon GA. (1987). The temperature-dependence of dormancy breaking in plants - computer-simulation of processes studied under controlled temperatures. *Journal of Theoretical Biology* 126 (3), 309-321.

**Tabla 1.** Datos promedio de los periodos 2013-2016 de las necesidades de frío y calor de las selecciones IMIDA-NOVAMED: Siroco 30<sup>®</sup>, Siroco 40<sup>®</sup> y Siroco 43<sup>®</sup>.

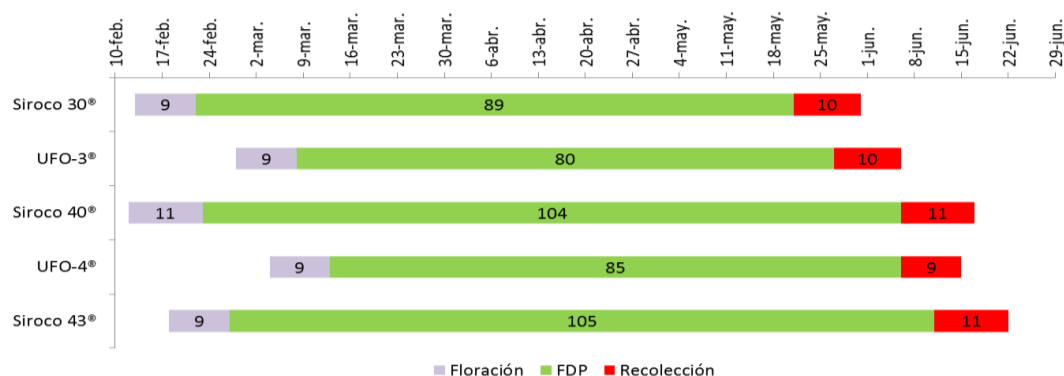
Variedad		HF <7°C	Unidades Richardson	Porciones	GDH Richardson
Siroco 30 <sup>®</sup>	Promedio	307,7±52,82	539,3±64,86	31,2±1,94	6815,3±792,42
Siroco 40 <sup>®</sup>	Promedio	310,33±67,80	508,67±79,26	30,28±3,03	7463,33±992,86
Siroco 43 <sup>®</sup>	Promedio	381,67±52,66	635,33±54,53	36,80±1,24	6615±679,48

**Tabla 2.** Fechas de recolección, floración y periodo de desarrollo del fruto de las selecciones IMIDA-NOVAMED: Siroco 30<sup>®</sup>, Siroco 40<sup>®</sup> y Siroco 43<sup>®</sup>.

Variedad	Año	Inicio recolección	Plena recolección	Final recolección	FDP	Inicio floración	Plena floración	Final floración
Siroco 30 <sup>®</sup>	2016	21-may-16	26-may-16	31-may-16	89	13-feb-16	18-feb-16	22-feb-16
Siroco 40 <sup>®</sup>	2016	06-jun-16	10-jun-16	17-jun-16	104	12-feb-16	18-feb-16	23-feb-16
Siroco 43 <sup>®</sup>	2016	11-jun-16	15-jun-16	22-jun-16	105	18-feb-16	22-feb-16	27-feb-16

**Tabla 3.** Datos promedio de los años 2013, 2014, 2015 y 2016 de las selecciones del programa de mejora IMIDA-NOVAMED: Siroco 30<sup>®</sup>, Siroco 40<sup>®</sup> y Siroco 43<sup>®</sup>

Variedad	% rojo	Dureza (Kg/cm <sup>2</sup> )	Peso (gr)	Calibre (mm) ecuatorial	Calibre (mm) longitudinal	Azúcar (°Brix)	Acidez (g. ac. Mal./l)
Siroco 30 <sup>®</sup>	96,44±1,8	4,57±0,2	138,04±10,2	72,85±1,1	41,54±1,8	12,45±0,5	2,29±0,2
Siroco 40 <sup>®</sup>	95,04±4,9	4,41±0,4	141,46±1,4	74,18±0,8	41,91±0,9	13,82±0,6	2,51±0,1
Siroco 43 <sup>®</sup>	98,27±1,3	4,44±0,8	154,41±11,4	76,19±2,4	43,30±1,8	13,70±1,6	2,25±0,3

**Figura 1.** Periodo de floración, FDP y recolección de las selecciones (2016) en la Hoya del Campo (Abarán) de Siroco 30, Siroco 40 y Siroco 43 y las variedades comerciales UFO 3 y UFO 4.**Figura 2.** Fotografía detalle de las selecciones IMIDA-NOVAMED: Siroco 30<sup>®</sup>, Siroco 40<sup>®</sup> y Siroco 43<sup>®</sup>.

## Pepino mosaic virus RNA-Dependent RNA Polymerase POL Domain Is a Hypersensitive Response-Like Elicitor Shared by Necrotic and Mild Isolate

### El dominio POL de la replicasa es el elicitor de necrosis del virus del mosaico del pepino dulce

R. Sempere<sup>1</sup>, C. Gómez-Aix<sup>1</sup>, F. Ruíz-Ramón<sup>1\*</sup>, P. Gómez<sup>1</sup>, B. Hasiów-Jaroszewska<sup>2</sup>, M. Sánchez-Pina<sup>1</sup>, and M. Aranda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS), CSIC, 30100 Espinardo, Murcia, Spain

<sup>2</sup>Institute of Plant Protection-National Research Institute, Department of Virology and Bacteriology, ul. Władysława Wegorka 20, 60-318 Poznań (Poland)

\*fruíz@cebas.csic.es

#### **Abstract**

**Pepino mosaic virus (PepMV) is an emerging pathogen that represents a serious threat to tomato production worldwide. PepMV-induced diseases manifest with a wide range of symptoms, including systemic necrosis. Our results showed that PepMV accumulation depends on the virus isolate, tomato cultivar, and environmental conditions, and associates with the development of necrosis. Substitution of lysine for glutamic acid at position 67 in the triple gene block 3 (TGB3) protein, previously described as a necrosis determinant, led to increased virus accumulation and was necessary but not sufficient to induce systemic necrosis. Overexpression of both TGB3 and the polymerase domain (POL) of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) resulted in necrosis, although only local expression of POL triggered HR-like symptoms. Altogether, our data suggest that the RdRp-POL domain plays an important role in PepMV necrosis induction, with necrosis development depending on the virus accumulation level, which can be modulated by the nature of TGB3, host genotype and environmental conditions.**

**Keywords:** necrosis; potexvirus; *Solanum lycopersicum*.

#### **Resumen**

**El virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) es un patógeno emergente que representa una grave amenaza para la producción de tomate. Las enfermedades inducidas por PepMV se manifiestan con una amplia gama de síntomas, incluyendo la necrosis sistémica. Nuestros resultados muestran que la acumulación de PepMV depende tanto del aislado del virus, como de la variedad de tomate o las condiciones ambientales, asociado todo ello al desarrollo de la necrosis. La sustitución de una lisina por un ácido glutámico en la posición 67 del triple bloque de genes (TGB3), previamente descrita como un determinante de la necrosis, parece favorecer una mayor acumulación del virus pero no parece ser el elemento elicitor de la necrosis sistémica. La sobreexpresión tanto de TGB3 como del dominio polimerasa (POL) de la replicasa (RdRp) produjo necrosis, aunque sólo la expresión local de POL desencadenó síntomas característicos de HR. En conjunto, nuestros datos sugieren que el dominio RdRp-POL desempeña un papel importante en la inducción de necrosis de PepMV, dependiendo del nivel de acumulación del virus, que puede ser modulado por la naturaleza de TGB3, el genotipo del huésped y las condiciones ambientales.**

**Keywords:** necrosis; potexvirus; *Solanum lycopersicum*.

## 1. INTRODUCCIÓN

La necrosis sistémica es uno de los síntomas inducidos por patógenos de las plantas que más pérdidas provoca en cultivos agrícolas. Un amplio número de estudios han demostrado que la necrosis sistémica tiene características de respuesta hipersensible (HR), incluyendo la inducción de la muerte celular programada. Más recientemente, algunos trabajos han descrito que los virus que inducen necrosis sistémica codifican una proteína elicitora, como lo hacen los virus inductores de HR [1]

El virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) causa una grave enfermedad en los cultivos de tomate en todo el mundo [2]. PepMV pertenece al género Potexvirus de la familia Alphaflexiviridae. Su genoma está formado por un ARN monocatenario de aproximadamente 6,4 kb que incluye 5 marcos abiertos de lectura (ORFs). El primero de ellos codifica la replicasa, que posee tres dominios, metiltransferasa (MET), helicasa (HEL) y polimerasa (POL), a continuación se encuentra el triple bloque de genes (TGB) que codifica TGB1, TGB2 y TGB3, involucrados en el movimiento viral y supresión de silenciamiento, y la proteína de la capsida (CP) que tiene un papel estructural, además de ser un supresor silenciador y necesario para el movimiento viral [3].

Se han descrito cinco genotipos diferentes de PepMV [4]. Pequeñas diferencias genéticas entre ellos dan lugar a grandes diferencias en la naturaleza y la gravedad de los síntomas. Se ha descrito que una sola mutación en el aminoácido número 67 del gen TGB3 (ácido glutámico en lugar de lisina, K67E) puede ser la causante de la conversión de una cepa suave de PepMV en una necrótica [5], aunque los mecanismos subyacentes siguen sin conocerse.

En este trabajo hemos estudiado la implicación de diferentes factores sobre la acumulación de PepMV y la inducción de necrosis, caracterizando el fenotipo de la misma.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Construcción de los plásmidos.

La mutación que causa la sustitución de aminoácidos K67E en TGB3 se generó por mutagénesis dirigida basada en PCR empleando cebadores específicos [3]. Las construcciones diseñadas para la expresión transitoria de los diferentes dominios de RdRp o proteínas de PepMV, se clonaron por sistema Gateway empleando pGWB como vector binario de destino.

### 2.2 Material vegetal e inoculación

Se han empleado seis variedades de tomate (Beta Lux, Malinowy Ozarowski y Koneser, de Polonia, y Boludo, Moneymaker, y Muchamiel de España). Estas plantas han crecido bajo dos condiciones medioambientales, la primera (condición ambiental I) 26 a 28 C día, 18 a 20 C noche, 16 h luz y la segunda (condición ambiental II) 21 a 22 C día, 15 a 16 C noche, 8 h luz, simulando verano e invierno, respectivamente. En tomate la inoculación se realizó de forma mecánica a partir de inóculo obtenido de plantas de *N. benthamiana* previamente agroinfectadas. La inoculación se realizó sobre la primera hoja totalmente expandida.

### 2.3 Detección de respuesta asociada a la defensa.

La detección histoquímica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en hojas de tomate y *N. benthamiana* se realizó con tinción histoquímica in situ dependiente de peroxidasa endógena. La detección histoquímica de O<sub>2</sub> se realizó por infiltración foliar d con tetrazolio nitro azul (NBT) a 0,1 mg/ml en tampón K-HEPES 25 mM (pH 7,6) e incubación a 25°C en la oscuridad durante 2 h. Las hojas se enjuagaron en etanol al 95% (vol/vol) durante 10min a 80°C, se montaron bajo agua destilada y se fotografiaron directamente usando un estereomicroscopio Olympus SZX PT.



### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

En un primer ensayo se analizó la influencia sobre la acumulación viral de las condiciones ambientales y del genotipo del virus. Para ello se inocularon plantas de seis variedades de tomate con dos cepas no necróticas, PepMV-Sp13 (tipo UE) y PepMV-PS5 (tipo CH2) [4], y con dos mutantes necróticos, PepMV-Sp13/TGB3<sub>K67E</sub> y PepMV-PS5/TGB3<sub>K67E</sub> (Figura 1A). 24 días post inoculación la acumulación de PepMV fue notablemente afectada por la interacción entre el tipo de aislado, las condiciones ambientales y la variedad de tomate. En concreto, los aislados necróticos se acumularon a niveles significativamente más altos que los aislados no necróticos y la condición ambiental I aumentó significativamente (doble) la acumulación viral con respecto a la condición II (Figura 1B). Cada variedad de tomate tuvo un efecto sobre la acumulación viral, Malinowy Ozarowski fue la variedad en la que se detectó una mayor carga viral seguida por Moneymaker, Koneser, Boludo, Muchamiel, siendo Beta Lux la variedad en la que menor título viral se detectó. A continuación, se examinó el impacto de la necrosis en todos los tratamientos. Los síntomas necróticos sólo se observaron en cultivares de tomate inoculados con PepMV-PS5/TGB3<sub>K67E</sub>. La gravedad de los síntomas necróticos varió de acuerdo con las condiciones ambientales, siendo mayor en la condición I y con los cultivares Beta Lux y Moneymaker. Los resultados sugieren que el desarrollo de necrosis está asociado con altos títulos virales, que a su vez depende del aislado y condiciones ambientales. Por lo tanto, la sustitución de aminoácidos K67E en TGB3 parece ser necesaria, pero no suficiente para la inducción de la necrosis sistémica. Una explicación plausible es que TGB3 esté implicado en la determinación de la necrosis aumentando la acumulación del virus en plantas infectadas con PepMV.

Para caracterizar la necrosis sistémica inducida en tomate por las cepas necróticas de PepMV, se analizaron las características bioquímicas asociadas con la muerte celular. Se inocularon plantas de tomate Moneymaker con los cuatro aislados de PepMV. Seis semanas después de la inoculación sólo las plantas infectadas con los aislados necróticos mostraron necrosis (Figura 2A). No se detectó acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o O<sub>2</sub> en hojas infectadas con aislados no necróticos. Se analizó la necrosis también en plantas de *N. benthamiana* inoculadas con PepMV-PS5 y PepMV-PS5/TGB3<sub>K67E</sub> y se encontraron resultados similares (Figura 2B). Los niveles de acumulación viral son casi diez veces mayores en plantas inoculadas con PepMV-PS5/TGB3<sub>K67E</sub> que en plantas inoculadas con PepMV-PS5 (Figura 2C). En *N. benthamiana* los resultados sugirieron que la inducción de necrosis estaba correlacionada con una mayor acumulación de virus. Para evaluar si un aislado no necrótico de PepMV puede causar necrosis al acumularse en niveles altos, coinfiltramos clones agroinfectivos de longitud completa de PepMV-Sp13 o PepMV-PS5 junto con el supresor silenciador p19. A los 5 días postinfiltración aparecieron manchas necróticas sólo en hojas co-agroinfiltradas con p19, que se asemeja a la respuesta necrogénica descrita anteriormente (mostrada para PepMV-Sp13). Estos resultados sugieren fuertemente que un aislado no necrótico puede causar la necrosis cuando alcanza niveles de acumulación altos.

Con la finalidad de mapear el elicitor de la necrosis en el genoma viral, se expresaron en *N. benthamiana* los diferentes genes de PepMV utilizando vectores pGWBs. La expresión transitoria de ambas versiones de TGB3, TGB3<sub>K</sub> y TGB3<sub>E</sub>, indujo el mismo fenotipo que consistente en necrosis venosa débil que se asemeja a un efecto citotóxico. Sin embargo la expresión de dominio POL desencadenó un fenotipo característico de necrosis que se asemeja claramente al fenotipo de necrosis descrito anteriormente para inoculaciones con toda la construcción del virus. Estos resultados indican que el dominio POL de la RdRp codificada por los aislados sintomáticos y asintomáticos de PepMV es un inductor de necrosis.

#### 4. CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren que el desarrollo de la necrosis se asocia con altos títulos virales, que a su vez dependen del aislado, del cultivar de tomate y de las condiciones ambientales. La sustitución de aminoácidos K67E en TGB3 parece ser necesaria pero no suficiente para la inducción sistémica de necrosis. Se demostró que la necrosis sistémica, tanto en tomate y *N. benthamiana* comparte características de respuesta hipersensible. También se mapeó el elicitor de la necrosis en el genoma de PepMV, en un dominio conservado de la RdRp.

#### 5. AGRADECIMIENTOS

Agradecer la financiación del Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2012-37390 ) y la fundación Séneca por la financiación de la Beca FPI.

#### 6. REFERENCIAS

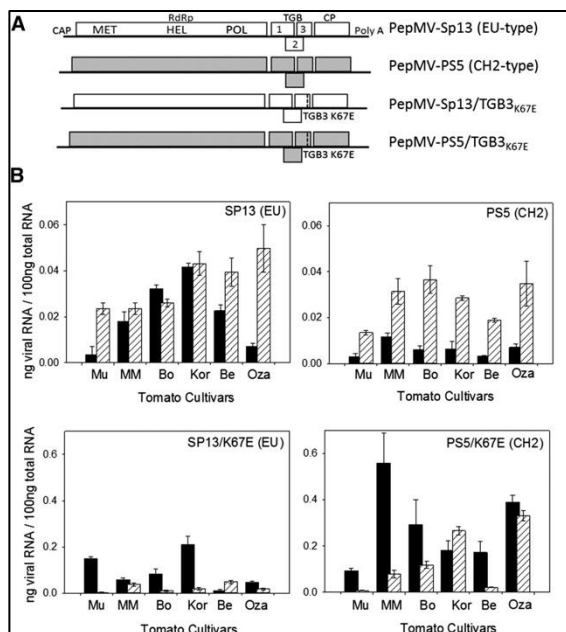
[1] Sempere, R., Gómez-Aix C, Ruíz-Ramón F, Gómez P, Hasiów-Jaroszewska B, Sánchez-Pina M.A, Aranda M.A. 2016 Pepino mosaic virus RNA-Dependent RNA Polymerase POL Domain Is a Hypersensitive Response-Like Elicitor Shared by Necrotic and Mild Isolates. *Virology*.

[2] Gómez, P., Sempere, R., and Aranda, M. A. 2012. Pepino mosaic virus and Tomato torrado virus: Two emerging viruses affecting tomato crops in the Mediterranean Basin. *Adv. Virus Res.* 84:505-532.

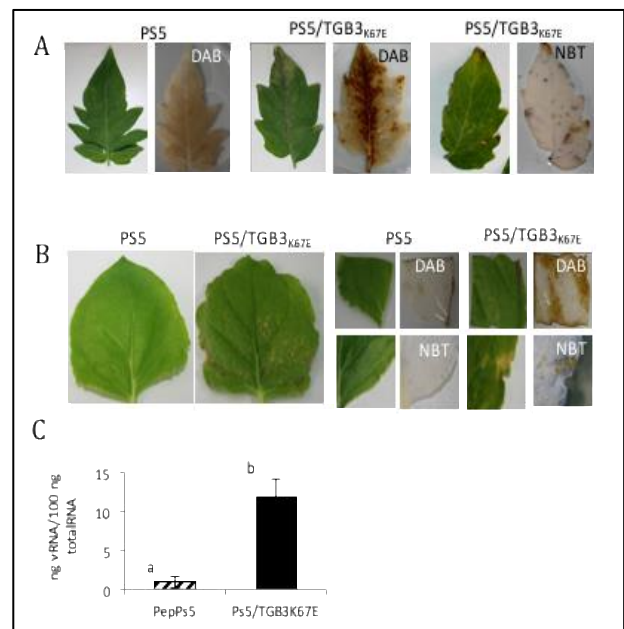
[3] Sempere, R., Gomez, P., Truniger, V., and Aranda, M. A. 2011. Development of expression vectors based on Pepino mosaic virus. *Plant Methods* 7:6.

[4] Gómez, P., Sempere, R., Elena, S., and Aranda, M. A. 2009. Mixed infections of Pepino mosaic virus strains modulate the evolutionary dynamics of this emergent virus. *J. Virol.* 83:12378-12387

[5] Hasiów-Jaroszewska, B., and Borodynko, N. 2012. Characterization of the necrosis determinants of the European genotype of Pepino mosaic virus by site specific mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Arch. Virol.* 157: 337-341.



**Figura 1.** Necrosis sistémica producida por PepMV asociada al título viral.



**Figura 2.** Caracterización de la necrosis en tomate y *N. benthamiana*.

## Morphological and agronomical characterization of local accessions of cowpea in South Eastern Spain

## Caracterización morfológica y agronómica de accesiones locales de caupí en el Sureste español

M. Martos-Fuentes<sup>1,2\*</sup>, C. Egea-Gilabert<sup>2,3</sup>, J. Weiss<sup>2,3</sup>, M. Egea-Cortines<sup>2,3</sup>, J.A. Fernández<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Producción Vegetal, Paseo Alfonso XIII, 48, E.T.S. Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, 30203, Cartagena, España.

<sup>2</sup> Instituto de Biotecnología Vegetal. Edificio I+D+i, Plaza del Hospital s/n. Campus Muralla del Mar, Universidad Politécnica de Cartagena, 30202, Cartagena, España.

<sup>3</sup> Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria, Paseo Alfonso XIII, 48, E.T.S. Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, 30203, Cartagena, España.

\*marina.fuentes@upct.es

### Abstract

Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) is a crop from Southern Africa used for human food and for fodder livestock. The aim of this work was the morphological and agronomical characterization of several local accessions of cowpea in two consecutive years in South Eastern Spain in a conventional management system. Fifteen cowpea local accessions from Murcia, Portugal and Greece and a reference line from Nigeria were used. The morphological and agronomical traits were evaluated based on descriptors according to the International Board for Plant Genetic Resources. In both years, significant differences were observed within all descriptors used. The highest yield was observed in local accessions from Murcia, Vi13 and BGE038474. The highest percentage of protein content in dry seeds was obtained in 2016 by the Portuguese accession Cp5051, with 27.85%. The pods morphology (width and length) was significantly different among the subspecies analyzed, since the subspecies *sinensis* has short pods and *sesquipedalis* has long pods. These results indicate that genetic variability plays an important role in crop yield and quality of production.

**Keywords:** Legumes; yield; Kjeldahl method.

### Resumen

El caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp.) es un cultivo sudafricano utilizado tanto para consumo humano como animal. El objetivo de este estudio fue la caracterización morfológica y agronómica de distintas accesiones locales de caupí en el sureste de España durante dos años, en condiciones de cultivo convencional. Se utilizaron 15 accesiones locales de Murcia, Portugal y Grecia y una línea de referencia de Nigeria. Para la caracterización se usaron descriptores de acuerdo al "International Board for Plant Genetic Resources", observándose diferencias significativas en ambos años para todos ellos. El mayor rendimiento del cultivo se observó en las accesiones locales de Murcia, Vi13 y BGE038474. El mayor porcentaje en proteína de la semilla seca la obtuvo en 2016 la accesión portuguesa Cp5051, con un 27,85%. Hubo diferencias en la morfología de la vaina (anchura y largura), entre las subespecies analizadas, ya que la subespecie *sinensis* es de vaina corta y la *sesquipedalis* de vaina larga. Estos resultados indican que la variabilidad genética juega un papel importante en el rendimiento del cultivo y la calidad de la producción.

**Palabras clave:** Leguminosas; productividad; método Kjeldahl.

## 1. INTRODUCCIÓN

El caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp.) es un cultivo de origen sudafricano que pertenece a la familia *Fabaceae*, tribu *Phaseoleae* y género *Vigna*. Dentro de este género podemos encontrar subespecies y variedades dependiendo de la morfología y domesticación [1]. Este cultivo se produce sobretodo en África, pero también es importante en América Central, Sudamérica, Sudeste Asiático y Sur de los EE.UU [2]; [3]. También se está cultivando a pequeña escala en muchas zonas de la cuenca mediterránea [4]. Como leguminosa, el caupí es capaz de hacer simbiosis con rizobios y fijar el nitrógeno, lo que implica una reducción de la contaminación por nitratos, ahorro y mejor adaptación en zonas de baja fertilidad. Además, es una de leguminosas más ampliamente adaptadas, versátiles y con buen contenido proteico en grano [5].

Este trabajo se enmarca dentro del Proyecto de Investigación Europeo EUROLEGUME, que trata de encontrar accesiones locales de leguminosas que se adapten bien y tengan una buena producción de proteína, para consumo humano como animal. En este caso en concreto, el objetivo fue caracterizar 15 accesiones de caupí, 14 de ellas autóctonas de distintas localizaciones del sureste europeo, para identificar los mejores cultivares para un posterior programa de mejora.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Material vegetal:

En este estudio se usaron 15 accesiones de caupí. Una línea de referencia, IT 97K-499-35, del “International Institute of Tropical Agriculture”, de Nigeria. Seis accesiones locales de la Región de Murcia: BGE038479, BGE044375, BGE040000, BGE038478, BGE038474 (donadas por el Centro de Recursos Fitogenéticos-Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria) y Vi13 (donada por la Red Murciana de Semillas). Seis accesiones locales de Portugal: Vg59, Vg60, Vg73, Cp4877, Cp5051, Cp5553 de la “Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro” y del “Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária”. Y por último dos accesiones locales de Grecia AUA1 y AUA2 de “The Agricultural University of Athens”. Todas las accesiones eran de la subespecie *sinensis*, es decir, de vaina corta, de salvo BGE044375, BGE040000 y Vi13 que eran de la subespecie *sesquipedalis* de vaina larga.

### 2.2. Siembra y condiciones de suelo:

Se realizó siembra directa a mano el 29 Mayo 2015 y el 15 Junio de 2016. Se dispusieron cuatro repeticiones por accesión en bloques aleatorios y la densidad de plantación fue de 10 semillas/m<sup>2</sup>. Los bloques tenían 7 m<sup>2</sup>, con una longitud de 8 m y una anchura de 0,9 m. Antes de la siembra, en ambos ciclos de cultivo, se preparó el suelo y se aplicaron por riego por goteo 30 kg/ha de nitrato amónico, 170 kg/ha de nitrato potásico y 250 kg/ha de fosfato monoamónico en cada ciclo de cultivo.

### 2.3. Caracteres agronómicos y morfológicos:

Para dicha caracterización se emplearon una serie de descriptores morfológicos, de acuerdo al “International Board for Plant Genetic Resources” [6]. Los datos fenotípicos de los días de floración y maduración se recogieron cuando el 50% de las plantas comenzaron a florecer y tuvieron vainas maduras. La altura de la planta, la altura hasta la primera vaina, la longitud y el ancho de la vaina y el número de semillas por vaina se midieron en diez plantas por bloque seleccionadas al azar. Se evaluó el rendimiento de semilla por planta en g/m<sup>2</sup>. El contenido de proteínas de la semilla seca [7] se obtuvo a través del análisis del contenido de Nitrógeno (N), que se determinó mediante el método de Kjeldahl [8].

### 2.4. Análisis estadísticos:

Los análisis de varianza de todos los descriptores se hicieron mediante un test ANOVA simple y el test LSD de Fisher en el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dentro de los descriptores analizados se observó que las accesiones más precoces para entrar en producción fueron BGE038479, Cp5051 y Cp5553 que tan solo necesitaron 60 y 50 días para los años 2015 y 2016 respectivamente (datos no mostrados). Las accesiones significativamente tardías fueron Vg73, BGE044375, y BGE038474. Las dos primeras tardaron en florecer 80 y 60 días para los años 2015 y 2016, respectivamente (datos no mostrados). Y en cuanto a la accesión BGE038474, la más tardía, en 2015 tardó en 90 días y 80 en 2016.

En ambos años, se observó que la accesión significativamente más alta fue BGE038478, que llegó a alcanzar los 3 m (Figura1). La más baja fue la línea de referencia IT 97K-499-35, la cual apenas superó los 80 cm de altura. Las menores alturas hasta la primera vaina las obtuvieron las plantas rastreras, como AUA2, Vg59, Vg60, y Vg73, (entre 30 y 32cm). Sin embargo las accesiones trepadoras (Figura1) obtuvieron alturas mayores hasta sus primeras vainas, como fue el caso de BGE044375, BGE040000 y Vi13 (entre 57 y 60cm).

En cuanto a la morfología de la vaina se observan diferencias significativas tanto en la anchura y como en la longitud. Pero dentro de la longitud observamos unas diferencias muy grandes debidas a las dos subespecies analizadas. La subespecie *sinensis* con vainas que no llegan a alcanzar los 30cm y la *sesquipedalis* las cuales pueden alcanzar hasta 1m (Figura 2). El mayor rendimiento del cultivo se observó en las accesiones locales de la Región de Murcia, Vi13 y BGE038474 con 200 g/m<sup>2</sup> (datos no mostrados). Finalmente, el mayor porcentaje de proteína de la semilla seca la obtuvo la accesión portuguesa Cp5051 por encima del 25% para ambos años (Figura 3).

### 4. CONCLUSIONES

Estos resultados indican que la variabilidad genética de las accesiones juega un papel importante en el rendimiento del cultivo y la calidad de la producción.

### 5. AGRADECIMIENTOS

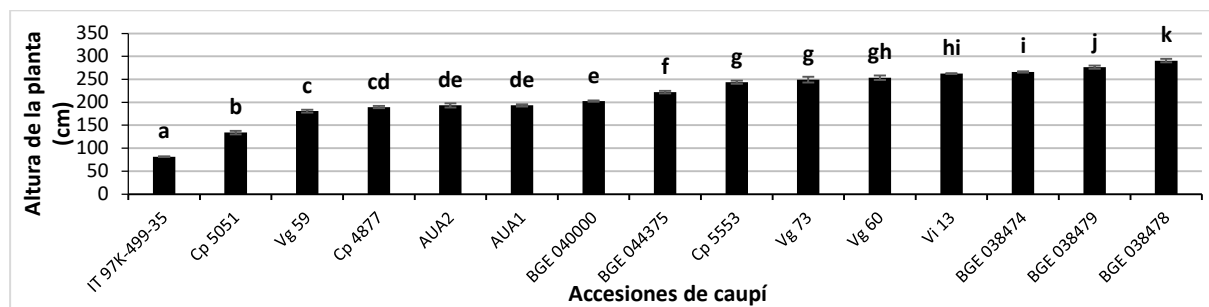
Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto Europe EU FP7 Research Project N° 613781 “Enhancing of legumes growing in Europe through sustainable cropping for protein supply for food and feed” EUROLEGUME.

### 6. REFERENCIAS

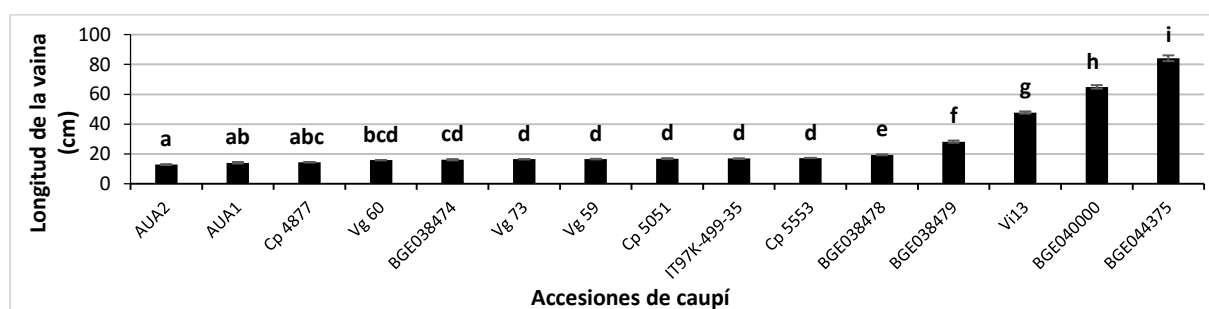
- [1] Padulosi S., Ng N.Q. 1997. Origin, taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: Advances in cowpea research, Singh B.B., MohanRaj D., Dashiell K.E., Jackai L.E.N., eds. (IITA-JIRCAS, Ibadan, Nigeria). Pp. 1-12.
- [2] Davis D.W., Oelke E.A., Oplinger E.S., Doll J.D., Hanson C.V., Putnam D.H. 1991. Cowpea Exploration. University of Wisconsin-Extension, Cooperative Extension and Alternative Field Crops Manual.
- [3] Timko M.P., Ehlers J.D., Roberts P.A. 2007. Cowpea. In: Genome mapping and molecular breeding in plants: Pulses, sugar and tuber crops, Kole C., ed. (Springer-Verlag, Berlin Heidelberg). Pp. 49-67.
- [4] Domínguez-Perles R., Carnide V., Marques G., de Castro I., de Matos M., Carvalho M., Rosa E., (2015) Relevance, constraints and perspectives of cowpea crops in the Mediterranean Basin. Legume Perspectives. 10: 40-42.
- [5] Ehlers J.D., Hall A.E. 1997. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). Field Crop. Res. 53: 187-204.
- [6] IBPGR 1982. Descriptors for cowpea. International Board for Plant Genetic Resources, Rome.

[7] Helrich, K. 1990. Official methods of Analysis, 15<sup>th</sup> ed, Helrich K., ed. (Association of Official Analytical Chemists Inc., Arlington, VA, USA). Pp. 935–937.

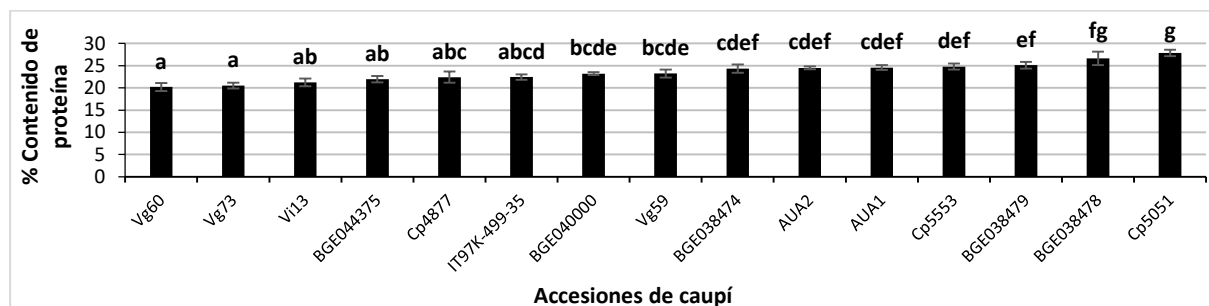
[8] Hoeger R. 1998. Büchi training papers, Nitrogen determination according to Kjeldahl. Copyright©, BÜCHI Labortechnik AG. Pp. 4-10.



**Figura 1.** Altura media de las planta de las distintas accesiones de caupí durante los dos cultivos de 2015 y 2016.



**Figura 2.** Longitud media de la vaina de las distintas accesiones de caupí durante los dos cultivos de 2015 y 2016.



**Figura 3.** Media del porcentaje del contenido en proteína de la semilla seca para las accesiones de caupí analizadas durante los dos cultivos de 2015 y 2016.

# Agrobacterium-mediated genetic transformation of Petunia for gene silencing using Kanamycin as the selection agent.

## Transformación genética de Petunia mediada por *Agrobacterium* para el silenciamiento génico, utilizando Kanamicina como agente selectivo.

C. Brandoli<sup>1\*</sup>, C. Petri-Serrano<sup>2</sup>, J. Weiss<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena, Murcia, España.

\*claudio.brandoli@gmail.com

### Abstract

The soil bacterium, *Agrobacterium tumefaciens*, is a plant pathogen responsible for tumour induction in dicotyledonous plants. Due to its ability to transfer a very specific segment of DNA to the plant cells, it is nowadays the most frequently method used for the introduction of genes into plants cells, overexpression of genes or for gene silencing. This manuscript deals the transformation of the plant model Petunia mediated by *Agrobacterium tumefaciens*.

**Keywords:** Plant transformation; RNA interference; recombinant plasmid.

### Resumen

La bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens*, es un patógeno vegetal responsable de la inducción de tumores en dicotiledóneas. Debido a su capacidad de transferir un segmento muy específico de ADN a células vegetales es el método más frecuentemente utilizado para la introducción de genes en plantas, la sobreexpresión de genes o el silenciamiento génico. En este documento se trata de la transformación de la planta modelo Petunia mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

**Palabras clave:** Transformación de plantas; ARN de interferencia; plásmido recombinantes.

## 1. INTRODUCCIÓN

La transformación genética mediada por *Agrobacterium* es hoy en día, la tecnología dominante utilizada para la producción de plantas genéticamente modificadas. En la naturaleza, *Agrobacterium* transforma genéticamente su huésped mediante la transferencia de un bien definido segmento de ADN de su plásmido inductor de tumores (Ti) al genoma de la célula huésped. El ADN transferido (T-DNA) lleva un conjunto de oncogenes (genes implicados en síntesis de auxinas y citoquininas) y genes necesarios para el catabolismo de las opinas. Su expresión en la célula vegetal, conduce al crecimiento neoplásico del tejido transformado y a la producción de aminoácidos utilizados principalmente como fuente de nitrógeno casi exclusivamente por las bacterias, (1) (2).

Hoy en día, para la transformación se utiliza el sistema binario, un método estándar que consta de dos plásmidos, un vector binario y un plásmido Ti desarmado, llamado auxiliar, que no tiene el T-DNA con los genes oncogenes, pero tiene la región vir. Por otro lado el vector binario lleva consigo el T-DNA, con un gen marcador de selección en plantas y nuestra construcción de interés. Esto se transforma en *E. coli* y seguido por la selección de las bacteria transformadas con el antibiotico de selección, se inserta el plásmido por electroporación en una cepa desarmada de *Agrobacterium*, que contiene el plásmido auxiliar, pero sin los genes oncogenes, (3). De esta manera, después de la activación por la planta herida, las proteínas de los genes vir del plásmido auxiliar, translocan el fragmento de ADN entre los dos bordes, derecho e izquierdo, del vector binario, en la célula vegetal. En las plantas, la kanamicina es el agente de selección más usado porque normalmente se usa el gen *nptII* como gen de selección. Su uso extendido se debe debido a su eficacia en la inhibición del crecimiento de las células no transformadas.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Material Vegetal

Fueron recolectadas semillas de *Petunia x hybrida*, de la variedad Mitchell W115.

### 2.2 Cepa de Agrobacterium y Plásmido Binario

Se utilizó la cepa desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 y como plásmido binario el plasmido Gateway® pHellsgate12 que tiene entre los bordes derecho e izquierdo el gen *nptII*, como gen marcador de selección con el promotor CaMV 35S. Las dos copias del gen de interés están dispuestas con orientación opuesta la una a la otra para obtener una estructura a horquilla, una vez introducida en el genoma de la planta y en esta manera, silenciar el gen de interes.

### 2.3 Técnicas de ADN Recombinante y de Selección

El plásmido se insertó por electroporación en *Agrobacterium* y se analizaron las colonias mediante PCR con cebadores específicos del gen *nptII* para comprobar la presencia del plásmido (cebador Forward: CCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGG, cebador Reverse: CGAAATCTCGTGATGGCAGGTTGG). Cada mezcla de reacción contenía aproximadamente 100ng/μl de ADN y se sometió al siguiente protocolo: 95°C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos divididos en fases de denaturación a 95°C durante 15 segundos, anillamiento a 60°C durante 15 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto, seguida por la fase de extensión terminal de 1 minuto a 72°C.

### 2.4 Condiciones de Cultivo y de Transformacion

El protocolo de transformación ha sido proporcionado por el laboratorio de Tom Gerats (Nijmegen) y reúne también la experiencia de Peter de Groot (Nijmegen) y Dave Clark (University of Florida) (4).

Las semillas de *Petunia* fueron esterilizadas en superficie durante 1 min con Etanol al 95%, puestas 25 min en una solución al 25% de lejía y lavadas 3 veces con agua destilada estéril. Una vez secadas bajo campana de flujo, fueron colocadas en placas Petri contenientes un medio de cultivo (para la composición del medio, ver tabla n1). Una colonia de *Agrobacterium* con el plásmido binario se cultivó durante una noche en 20ml de medio LB líquido con los antibióticos correspondientes a 28°C y a 180 rpm. Las hojas se cogieron desde plántulas *in vitro* jóvenes, completamente desarrolladas y sin incluir el pecíolo. Se colocaron sobre un papel de filtro estéril y se cortaron en piezas de 1x1 cm aproximativamente. Se centrifugó el cultivo de *Agrobacterium* durante 10 minutos a 4000 rpm. Se dispusieron las hojas cortadas en la suspensión bacteriana durante 15 minutos. Posteriormente, las hojas se secaron utilizando el papel de filtro estéril y se



distribuyeron 8/9 explantos por placa de co-cultivo dejándolas incubar durante 3 días en cámara de cultivo [16-h fotoperiodo ( $20-25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , lámpara fluorescente de color blanco frío) a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ], (para la composición del co-cultivo, ver tabla n1).

Tres días después los explantos se transfirieron a medio de selección y se incubaron una semana en cámara de cultivo a las condiciones precedentes pero en oscuridad y posteriormente se expusieron gradualmente a la luz hasta la formación de los callos (para la composición del cultivo de selección, ver tabla 1). Con el aparecer de los brotes, se pusieron en nuevas placas con un medio de enraizamiento por las siguientes 6 semanas (para la composición del cultivo de enraizamiento, ver tabla n1). A la comparsa de las raíces se quitaron cuidadosamente del cultivo gel y se pusieron a crecer en tierra.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

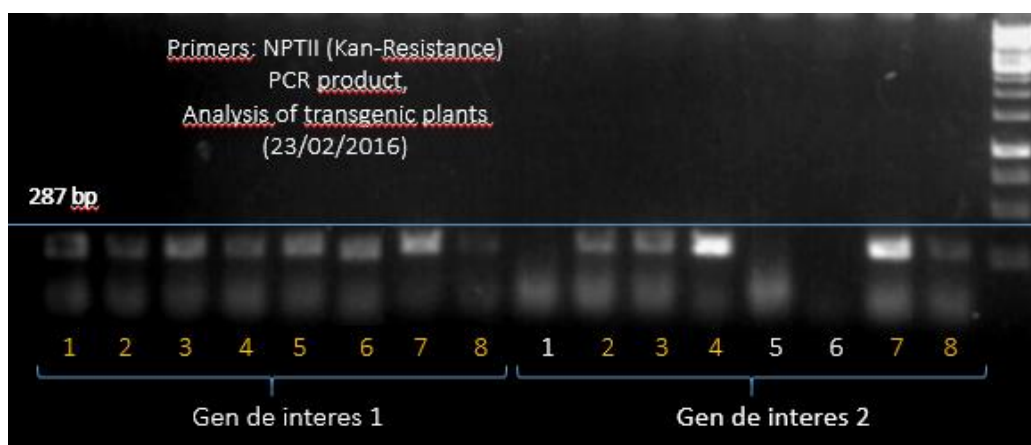
Del experimento, se obtuvieron una eficiencia de transformación respectivamente del 16,6% en las plantas transformadas con la construcción que lleva el inserto del gen 1 y del 10,41%, las del gen 2 (ver tabla 2). Se transformaron por cada construcción, 48 explantos de tejido vegetal, de los cuales, resultaron transgénicas, a la análisis PCR, respectivamente 8 plantas por el inserto del gen 1 y 5 plantas por el inserto del gen 2 (ver imagen 1 por el análisis en gel de agarosa al 1,5%). Este trabajo forma parte de un proyecto de tesis donde se pretende a analizar los cambios fenotípicos y bioquímicos inducidos por el silenciamiento de genes y la mutación genética en Solanáceas con el objetivo de profundizar en el conocimiento de la función de este gen y su posible regulación.

### 4. REFERENCIAS

- (1) Tzfira, T., & Citovsky, V. (2006). Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(2), 147–154. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.01.009>
- (2) Ziemienowicz, A. (2001). Odyssey of Agrobacterium T-DNA. *Acta Biochimica Polonica*, 48(3), 623–635.
- (3) Lee, L.-Y., & Gelvin, S. B. (2007). T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiology*, 146(2), 325–332. <http://doi.org/10.1104/pp.107.113001>
- (4) Izaskun Mallona Gonzalez, M. Egea-Gutierrez-Cortines, J. Weiss, 2012. Identification of novel genes involved in Petunia flower development using transcript profiling and reverse genetics. Universidad Politécnica de Cartagena, Instituto de Biotecnología Vegetal. Pp.125-126, Apéndice A, información suplementaria.

### 5. AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer al Instituto de Biotecnología Vegetal (IBV), especialmente a mi director y codirector de tesis, la Dra. Julia Weiss y al Dr. Cesar Petri Serrano por su disposición y su valioso asesoramiento. Esta obra forma parte de los proyectos BFU-2013-45148-R y Seneca 19398/PI/14.



**Imagen 1:** Análisis en gel de agarosa al 1,5% de la amplificación PCR con cebadores dirigidos al gen *nptII*, para la selección de plantas transgénicas .

**Tabla 1.** Medios de cultivo

	Medio estándar	Medio de co-cultivo	Medio de selección	Medio de enraizamiento
Sàles + Vitaminas	MS	½MS	½MS	½MS
Sacarosa	15 g	30 g	30 g	30 g
Gel	4 g	4 g	4 g	4 g
BAP	—	2 mg/l	2 mg/l	—
NAA	—	0,1 mg/l	0,1 mg/l	—
Kanamicina	—	—	300 mg/l	300 mg/l
Cefotaxima	—	—	500 mg/l	500 mg/l

**Tabla 2.** Resultados de la transformación

	Gen 1	Gen2
Nº de muestras	48	48
Porcentaje de regeneración	62,5%	58,3%
Nº de callos sobrevividos	53,3%	60,7%
Porcentaje de transformación	50%	29,4%
Eficiencia de transformación	16,6%	10,41%

## Levels of stress markers in populations of *Pinus halepensis* growing in different mine tailings

## Niveles de marcadores de estrés en poblaciones de *Pinus halepensis* crecidas en balsas mineras

A. López-Orenes<sup>1\*</sup>, M.A. Ferrer<sup>1</sup>, A.A. Calderón<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria. Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena (España).

\*antonio.orenes@upct.es

### Abstract

Soil pollution by heavy metals/metalloids (HMMs) is a problem worldwide. To prevent dispersion of contaminated particles by erosion, the maintenance of a vegetative cover is needed. Some plant species are able to thrive under these multi-stresses. This study aimed to investigate the metabolic adjustments involved in *Pinus halepensis* acclimative responses to conditions prevailing in HMM-enriched mine-tailings piles, during Mediterranean spring and summer in two consecutive years. Approximately 30 biochemical and physiological parameters were examined, including leaf redox components, primary and secondary metabolites and endogenous levels of salicylic acid. Multivariate data analysis showed a clear distinction in antioxidative/oxidative profiles between and within the populations studied. *P. halepensis* displayed a high physiological plasticity that probably allows it to successfully shift its metabolism to withstand the multiple stresses that plants must cope with in mine tailings piles under Mediterranean climatic conditions.

**Keyword:** *antioxidant system*; mine tailing; stress and revegetation.

### Resumen

La contaminación del suelo por metales pesados/metaloides (HMMs) es un problema mundial. Para evitar la dispersión de las partículas contaminadas por la erosión, se necesita el mantenimiento de una cubierta vegetal estable. Algunas especies vegetales son capaces de prosperar bajo estos escenarios de múltiple estrés. El objetivo de este estudio fue investigar los ajustes metabólicos que intervienen en las respuestas de aclimatación de *Pinus halepensis* a las condiciones que prevalecen en las balsas de estériles mineros durante la primavera y el verano mediterráneos en dos años consecutivos. Se examinaron aproximadamente 30 parámetros fisiológicos y bioquímicos, incluyendo componentes del estado redox de la hoja, metabolitos primarios y secundarios, y niveles endógenos de ácido salicílico. El análisis multivariante de los datos mostró una clara distinción entre los perfiles antioxidantes/oxidativos de las poblaciones estudiadas y dentro de ellas. *P. halepensis* muestra una alta plasticidad fisiológica que le permite cambiar con éxito su metabolismo para soportar los múltiples estreses que las plantas deben soportar en las balsas de estériles mineros en las condiciones climáticas mediterráneas.

**Palabras clave:** sistemas antioxidantes; balsas de estériles mineros; estrés y revegetación.

## 1. INTRODUCCIÓN

La contaminación por metales del suelo es un problema en todo el mundo debido a los impactos ecológicos, ambientales y sobre la salud humana, además de que el aumento de los metales pesados en el medio junto con su elevada persistencia, favorecen su bioacumulación a lo largo de la cadena trófica. Un exceso de Pb o de otros metales pesados, al igual que otros factores estresantes, puede provocar una alteración del estado redox a nivel celular, dando lugar a un estado pro-oxidativo que activaría toda una serie de reacciones en las que se generan y acumulan especies activadas del oxígeno (EAO). Las EAO, como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), son productos universales del metabolismo aeróbico y reaccionan muy fácilmente con las macromoléculas biológicas, provocando la peroxidación de lípidos, modificaciones de aminoácidos, ruptura y agregación de proteínas y mutaciones y deleciones en los ácidos nucleicos. El  $H_2O_2$  participa en el metabolismo vegetal, pero también actúa como molécula señal y participa en la regulación del crecimiento y desarrollo vegetales y en las respuestas al estrés. Sin embargo, el  $H_2O_2$  puede convertirse mediante reacciones de tipo Fenton en radical hidroxilo. Este compuesto es uno de los oxidantes más potentes que se conocen y, al reaccionar con macromoléculas esenciales, altera gravemente el metabolismo celular.

En todas las células existe un balance intracelular entre generación y consumo de EAO. Para regular el estado redox de la célula es necesario una coordinación eficiente de las reacciones que ocurren en los diferentes compartimentos celulares y que están gobernadas por una compleja red de sistemas pro- y antioxidantes. Los sistemas antioxidantes están constituidos por metabolitos de bajo peso molecular (ascorbato, glutatión, cisteína, compuestos fenólicos, tocoferoles, carotenoides) y diversos sistemas enzimáticos. La prevención del estrés oxidativo o la eliminación de EAO parecen ser estrategias prometedoras para obtener plantas tolerantes a diferentes estreses abióticos.

*Pinus halepensis* es una especie de plantas leñosas que ha sido ampliamente utilizada en la restauración de ecosistemas semiáridos degradados en el área mediterránea. Además, se ha propuesto que algunas especies de pino podrían ser utilizadas como bioindicadores de la disponibilidad de metal(oid)es en sitios contaminados por estos elementos [1]. Por tanto, *P. halepensis* es una especie prometedora para la restauración de las zonas contaminadas por metales pesados en el sureste español, a pesar de que los mecanismos implicados en la tolerancia sean todavía, en gran parte, desconocidos. Numerosos estudios han puesto de manifiesto diferencias a nivel metabólico entre poblaciones metalíferas y no metalíferas de especies vegetales, y que las poblaciones de plantas pueden evolucionar en respuesta a las condiciones ambientales.

En el presente trabajo se analizan los niveles de algunos metabolitos y enzimas, relacionados con la tolerancia al estrés, en poblaciones de *P. halepensis* procedentes de balsas de estériles mineros como paso previo para evaluar las posibilidades de esta especie como herramienta para la revegetación/estabilización de estas estructuras mineras en el marco climático semiárido del sureste ibérico.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Material Vegetal

Se tomaron muestras de acículas de *P. halepensis* crecidas en el Distrito Minero de Cartagena-La Unión, concretamente en 4 balsas de estériles mineros (Agustin, Mercader, Ripolles y Wikon) y en una zona no contaminada localizada a 1.5 km de distancia [2]. Los muestreos se llevaron a cabo en la primavera (mayo) y el verano (septiembre) de dos años consecutivos.

## 2.2. Determinación de marcadores de estrés

La peroxidación lipídica de los tejidos vegetales se estimó mediante el ensayo del ácido tiobarbitúrico y la reacción de los grupos carbonilo con 2,4-dinitrofenilhidrazina se usó para determinar el grado de oxidación proteica. [2]

2.3. Análisis de compuestos antioxidantes y determinación de la capacidad antioxidante: El contenido de ácido ascórbico total y reducido se determinó mediante absorbancia a 260 nm antes (ascorbato reducido) y después (ascorbato total) del tratamiento de los extractos con ditiotreitol. Los niveles de glutatión total se determinaron mediante el método de reciclado enzimático. La cuantificación de fenoles solubles totales se realizó mediante técnicas espectrofotométricas, además, se cuantificaron los niveles de flavonoides, flavanoles y ácidos hidroxycinámicos (HCAs). La capacidad antioxidante total se determinó utilizando el método del DPPH, ABTS y FRAP. [2]

## 2.4. Cuantificación de la actividad de enzimas implicadas en la detoxificación de EAO:

La actividad de los sistemas enzimáticos desactivadores de EAO se realizó mediante el empleo de técnicas espectrofotométricas, de acuerdo con lo descrito en [2].

## 2.5. Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos y gráficos se llevaron a cabo utilizando el software R (<http://www.r-project.org>). Todos los datos fueron verificados para la normalidad y la homogeneidad de las varianzas. Cuando estas suposiciones no fueron cumplidas, se utilizó la familia de transformaciones de Box-Cox para normalizar los residuos del análisis de varianza (ANOVA). Se realizó el análisis de componentes principales (PCA) no supervisado y con los datos transformados.

## **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Con el fin de facilitar la detección de cualquier patrón estacional entre las cinco poblaciones *P. halepensis* y las inter-correlaciones entre los diferentes parámetros fisiológicos y antioxidantes/oxidativos evaluados, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) (Figura 1). Las tres primeras componentes (PC) capturaron el 60,48 % de la varianza entre las muestras. La primera componente principal (PC1), que representa el 32,42 % y la segunda componente principal (PC2), que representa el 18,06% de la varianza total, separó las muestras de control, agrupadas en el lado negativo del eje X e Y, de las muestras de las balsas, además se separaron claramente entre las muestras de primavera y verano. La primera PCA (PC1-PC2) se asoció positivamente con fenoles, flavanoles, flavonoides, HCAs, capacidad antioxidante total (ABTS, DPPH y FRAP), GSH y AA en el lado positivo del eje X y RWC en el lado negativo, y el eje Y se definió por los niveles de proteína (en el lado positivo del eje Y) y de peroxidasa soluble (sPRX, en el lado negativo). Por lo tanto, los resultados de la PCA sugirieron que hubo cambios estacionales bruscos entre los controles y las plantas de las balsas de estériles mineros, indicando que las plantas de *P. halepensis* mostraron una alta plasticidad fisiológica y fueron capaces de cambiar su metabolismo en respuesta al estrés por metales pesados de una manera dependiente de la estación y de las condiciones de cada pantano, siendo las poblaciones de los pantanos Agustín y Mercader más próximas en la PCA a las de la población control, y Ripolles y Wikon las más alejadas, y por tanto con mayores diferencias con respecto a la población de la zona control.

## **4. CONCLUSIONES**

El análisis de los resultados obtenidos muestra que los patrones de expresión de los parámetros analizados son marcadamente diferentes en mayo y septiembre y, además, estos patrones de expresión difieren entre las poblaciones, independientemente del tiempo de

muestreo considerado. Las plantas presentes en las balsas de estériles mineros tienen niveles similares de ciertos parámetros fisiológicos y bioquímicos y fueron significativamente mayores que los encontrados en plantas no mineras. Como las condiciones meteorológicas pueden ser descartadas para explicar las diferencias observadas entre las correlaciones de las variables, las condiciones edáficas deben ser los principales determinantes de la aptitud de las plantas. A pesar de estas diferencias *P. halepensis* se adapta a las condiciones estresantes de la zona y por tanto puede ser empleada con éxito para la revegetación de las balsas de estériles mineros minimizando el impacto causado en la zona.

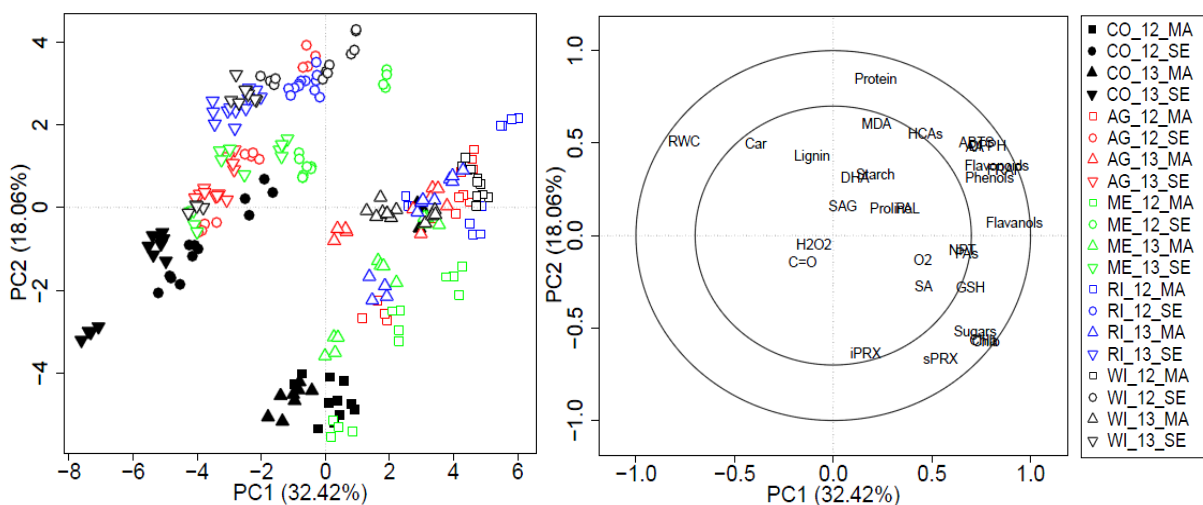
## 5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el MINECO (CGL2014-54029-R) y el MECD (beca FPU AP2012/02559). Parte del trabajo ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología Vegetal (IBV) de la UPCT.

## 6. REFERENCIAS

[1] Párraga-Aguado I, Álvarez-Rogel J, González-Alcaraz MN, Jiménez-Cárceles FJ, Conesa HM, (2013). Assessment of metal(loid)s availability and their uptake by *Pinus halepensis* in a Mediterranean forest impacted by abandoned tailings. Ecol. Eng. 58:84–90.

[2] López-Orenes A, Bueso MC, Conesa HM, Calderón AA, Ferrer MA (2017). Seasonal changes in antioxidative/oxidative profile of mining and non-mining populations of Syrian beancaper as determined by soil conditions. Science of the Total Environment 575, 437-447.



**Figura 1.** Análisis de Componentes Principales (PCA), para las dos primeras componentes, que explican un 50.48% de la varianza, aplicada a las variables fisiológicas y bioquímicas de hojas de *P. halepensis*.

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

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

A. Martínez-Bas<sup>1\*</sup>, M. Kessler<sup>2</sup>, J.J. Marín<sup>3</sup>, E. Armero<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Agricultura, Ciencia y Tecnología. Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT), Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Murcia, España.

<sup>2</sup> Murcia, España. Departamento de Matemáticas Aplicadas y Estadística. Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT), Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Murcia, España.

<sup>3</sup> QUIN Sociedad Cooperativa, Ctra. Vereda del Catalán, nº 62, 30162 Santa Cruz, Murcia, España.

\*anamartinezbas@hotmail.com

### **Abstract**

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

**Keywords:** Genetic line; diet; fatty acids; intramuscular fat.

### **Resumen**

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

**Palabras clave:** Línea genética; dieta; ácidos grasos; grasa intramuscular.

## 1. INTRODUCCIÓN

La carne de conejo es muy apreciada por su composición nutricional y sus propiedades dietéticas. Es recomendada en dietas bajas en colesterol, ya que previene enfermedades o trastornos cardiovasculares. La carne de conejo es más rica en ácido linoleico (C18:2n6) que otras carnes como vacuno, ovino, cerdo y pollo. Este ácido destaca en su papel antioxidante contra el ataque de la membrana por radicales libres y mejora los lípidos sanguíneos mediante la reducción de los triglicéridos y el colesterol [1].

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

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

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

Los resultados fueron analizados con el procedimiento Generalized Linear Model (GLM) [3]. Los diferentes ácidos grasos fueron analizados con el modelo que incluía la línea genética y el tipo de dieta como efectos fijos, ya que era el modelo que presentaba el menor valor de Akaike's Information Criterion (AIC). Las interacciones no fueron significativas. A partir de este modelo se obtuvieron las medias mínimo cuadráticas que fueron comparadas mediante un test t-student, considerando que eran diferentes para un nivel de significación  $P < 0,05$ .

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto de la línea genética en el perfil de ácidos grasos para la semana 8 (Tabla 1) muestra que Grimaud (GR) es diferente a Hyla (HY) y Ebro (EB) en el contenido de ácidos grasos insaturados, mientras que a la semana 12 (Tabla 2) los resultados varían, siendo la línea de aptitud maternal (HY) diferente significativamente a las dos líneas mejoradas por velocidad de crecimiento (EB y GR). A la semana 12 el ácido palmítico (C16:0) presentó diferencias significativas según la dieta (Tabla 2), siendo mayor el contenido de C16:0 en conejos alimentados con la dieta más energética (HE); ya que los diferentes niveles de fibra provocan una pequeña modificación del porcentaje de ácidos grasos en carne de conejo con pesos comerciales entre 2 y 2,5 kg. Respecto al ratio n6/n3 tanto en la semana 8 (Tabla 1) como en la semana 12 (Tabla 2), no encontramos diferencias significativas al ingerir una dieta u otra, a diferencia de [4] que encontraron una elevada influencia en este ratio según la dieta en toros alimentados con dietas con diferentes niveles de fibra (15,6 vs 2,0).

## 4. CONCLUSIONES

El contenido de grasa intramuscular incrementa durante la fase de engorde. El efecto de la línea genética se vio más pronunciado a mayor edad del conejo tanto en ácidos grasos saturados (SFA), ácidos grasos mono-insaturados (MUFA) como ácidos grasos poliinsaturados (PUFA).



Respecto a los ácidos de mayor interés nutricional, el mayor contenido de ácido palmítico (C16:0) (que incrementa los niveles de colesterol total y LDL) es a las 12 semanas con la dieta menos fibrosa (HE). El ratio omega 6/omega 3 descendió considerablemente conforme avanzaba el estado de madurez. No hubo efecto de la línea genética, la dieta o la edad en el porcentaje de ácido oleico (C18:1n9) que conlleva niveles bajos de colesterol e incidencia reducida de las enfermedades cardiovasculares.

## 5. AGRADECIMIENTOS

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

## 6. REFERENCIAS

- [1] FAO. 2012. Estudio FAO alimentación y nutrición. Grasas y ácidos grasos en nutrición humana. Consulta de expertos. 2008. Ginebra. ISBN 978-92-5-3067336.
- [2] O'Fallon J.V., Busboom J.R., Nelson M.L., Gaskins C.T. 2007. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils and feedstuffs. *J. Animal Sci.* 85: 1511-1521.
- [3] R Core Team. 2016. R: A language and environment for statistical computing. R 400 Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R401project.org/>.
- [4] Enser M., Hallet K.G., Hewett B., Fursey G.A.J., Wood J.D., Harrington G. 1998. Fatty acid content and composition of UK beef and lamb muscle in relation to production system and implications for human nutrition. *Meat Sci.* 49: 329-341.

**Tabla 1a.** Composición de grasa intramuscular (%) de ácidos grasos (%) en la grasa intramuscular en la carne de la pata según la línea genética y la dieta a las 8 semanas (media mínima cuadrática  $\pm$  error estándar).

Ác. graso	EB		GR		HY		C		HE	
	MMC	ES	MMC	SE	MMC	ES	MMC	SE	MMC	ES
% grasa intram	3,301a	0,838	3,172a	0,851	3,423a	0,835	3,243y	0,833	3,354y	0,851
C8:0	0,054a	0,001	0,048a	0,005	0,032a	0,009	0,041y	0,001	0,049y	0,004
C10:0	0,819a	0,024	0,829a	0,022	0,692a	0,032	0,796y	0,025	0,765y	0,021
C12:0	0,871a	0,031	0,841a	0,035	0,817a	0,054	0,851y	0,055	0,836y	0,054
C14:0	2,661a	0,350	3,198a	0,420	2,697a	0,220	2,837y	0,240	2,867y	0,350
C15:0	0,725a	0,010	0,837a	0,058	0,794a	0,085	0,799y	0,055	0,773y	0,064
C16:0	28,023a	0,050	28,673b	0,045	26,559c	0,056	27,687y	0,054	27,817y	0,330
C17:0	0,725a	0,052	0,834a	0,060	0,760a	0,054	0,772y	0,042	0,774y	0,035
C18:0	7,841a	0,088	8,469b	0,078	8,201c	0,031	8,066y	0,410	8,275y	0,055
C20:0	0,060a	0,001	0,102b	0,000	0,098b	0,012	0,910y	0,021	0,083z	0,022
C22:0	0,000a	0,090	0,002b	0,012	0,003a	0,090	0,000y	0,001	0,003z	0,000
C24:0	0,001a	0,001	0,003a	0,002	0,003a	0,001	0,001y	0,000	0,002y	0,001
C14:1n5	0,010a	0,010	0,095b	0,020	0,044ab	0,030	0,048y	0,031	0,051y	0,012
C15:1n5	0,224a	0,580	0,028a	0,057	0,026a	0,054	0,056y	0,012	0,099y	0,009
C16:1n7	1,778a	0,050	2,75b	0,070	1,994ab	0,080	2,259y	0,570	2,089y	0,788
C17:1n7	0,033a	0,670	0,182a	0,045	0,137a	0,031	0,112y	0,012	0,123y	0,015
C18:1n9	24,236a	1,200	23,389a	0,980	24,361a	0,770	23,864y	0,350	24,127y	0,250
C20:1n9	0,144a	0,020	0,264b	0,010	0,236b	0,020	0,190y	0,008	0,239z	0,008
C22:1n9	0,037a	0,001	0,094b	0,020	0,088b	0,005	0,069y	0,018	0,077y	0,017
C24:1n9	0,002a	0,001	0,004a	0,002	0,008b	0,003	0,005y	0,001	0,004y	0,002
C18:2n6	24,684a	0,320	21,879b	0,870	25,066a	0,450	24,083y	0,950	23,669y	0,894
C18:3n6	0,001a	0,010	0,033a	0,005	0,009a	0,009	0,015y	0,008	0,013y	0,004

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

**Tabla 1b (continuación).** Composición de grasa intramuscular (%) de ácidos grasos (%) en la grasa intramuscular en la carne de la pata según la línea genética y la dieta a las 8 semanas. (media mínima cuadrática  $\pm$  error estándar).

Ác. graso	EB		GR		HY		C		HE	
	MMC	ES	MMC	ES	MMC	ES	MMC	ES	MMC	ES
C18:3n3	1,642a	0,980	1,673a	0,870	1,631a	0,880	1,748y	0,680	1,549y	0,540
C20:3n6	0,077a	0,030	0,217a	0,050	0,218a	0,050	0,187y	0,010	0,155y	0,030
C20:4n6	2,459a	0,120	2,403a	0,130	2,636a	0,110	2,659y	0,210	2,339y	0,230
C20:5n3	0,001a	0,001	0,005a	0,001	0,004a	0,001	0,003y	0,004	0,002z	0,000
C22:6n3	0,029a	0,009	0,049a	0,008	0,102b	0,005	0,044y	0,012	0,059y	0,022
$\Sigma$ Saturado	42,118a	0,755	44,054a	0,768	40,739a	0,656	42,933y	0,929	42,497y	0,960
$\Sigma$ Insaturado	55,357a	0,890	53,065b	0,789	56,560a	0,854	55,342y	2,876	54,595y	2,821
$\Sigma$ Sat/Insat	0,760a	0,848	0,830a	0,974	0,721a	0,768	0,776y	0,323	1,530y	0,340
$\Sigma$ Omega 6	27,221a	0,650	24,532a	0,661	27,929a	0,432	26,944y	1,178	26,176y	1,158
$\Sigma$ Omega 3	1,672a	0,084	1,727a	0,090	1,737a	0,005	1,795y	0,696	1,610y	0,562
$\Sigma$ n6/n3	16,280a	3,210	14,205a	2,210	16,079a	1,250	15,011y	1,693	16,258y	2,060

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

**Tabla 2.** Composición de grasa intramuscular (%) de ácidos grasos (%) en la grasa intramuscular en la carne de la pata según la línea genética y la dieta a las 12 semanas (media mínima cuadrática  $\pm$  error estándar).

Ác. graso	EB		GR		HY		C		HE	
	MMC	ES	MMC	SE	MMC	ES	MMC	ES	MMC	ES
% grasa intram	4,040a	0,488	4,195a	0,871	3,844a	0,470	3,907y	0,468	4,145y	0,485
C6:0	0,200a	0,001	0,232a	0,015	0,087b	0,018	0,201y	0,022	0,145y	0,030
C8:0	0,030a	0,005	0,028a	0,004	0,018a	0,003	0,026y	0,005	0,025y	0,008
C10:0	0,355a	0,034	0,281a	0,024	0,277a	0,009	0,308y	0,006	0,300y	0,009
C12:0	0,479a	0,034	0,392a	0,025	0,392a	0,001	0,426y	0,027	0,416y	0,022
C14:0	4,240a	0,540	2,909a	0,310	2,666a	0,540	3,592y	0,150	3,951y	0,180
C15:0	0,956a	0,057	0,814a	0,031	0,703b	0,018	0,878y	0,057	0,771y	0,041
C16:0	28,048a	0,340	30,342b	0,250	26,697c	0,058	27,755y	0,057	28,970z	0,051
C17:0	0,963a	0,033	0,857a	0,055	0,782b	0,047	0,879y	0,054	0,855y	0,055
C18:0	8,524a	0,055	9,278b	0,085	9,065b	0,085	8,501y	0,850	9,41y	0,900
C20:0	0,153a	0,034	0,120a	0,005	0,111a	0,056	0,134y	0,054	0,122y	0,045
C22:0	0,001a	0,001	0,001a	0,001	0,006b	0,001	0,002y	0,005	0,003z	0,000
C24:0	0,006a	0,001	0,001b	0,007	0,003ab	0,008	0,003y	0,009	0,003y	0,001
C14:1n5	0,443a	0,030	0,166a	0,005	0,222ab	0,050	0,111y	0,070	0,443z	0,012
C15:1n5	0,031a	0,085	0,002a	0,075	0,000a	0,054	0,021y	0,004	0,001y	0,001
C16:1n7	3,736a	0,040	3,584a	0,088	3,462a	0,100	2,986y	0,988	4,202y	1,001
C17:1n7	0,407a	0,046	0,180b	0,054	0,238b	0,033	0,203y	0,078	0,348y	0,084
C18:1n9	24,212a	1,400	26,095a	0,780	26,687a	0,440	25,649y	1,020	25,680y	1,320
C20:1n9	0,532a	0,040	0,268b	0,020	0,321ab	0,070	0,257y	0,010	0,490y	0,140
C22:1n9	0,154a	0,020	0,125a	0,040	0,100a	0,068	0,118y	0,020	0,135y	0,050
C24:1n9	0,001a	0,002	0,001a	0,004	0,004b	0,051	0,001y	0,002	0,001y	0,001
C18:2n6	17,446a	0,230	18,764a	0,880	21,072b	0,055	20,375y	0,785	17,813y	0,854
C18:3n6	0,002a	0,020	0,054a	0,032	0,011a	0,022	0,021y	0,005	0,017y	0,004
C18:3n3	2,110a	0,780	0,948a	0,770	2,034a	0,077	1,664y	0,440	1,731y	0,540
C20:3n6	0,171a	0,040	0,117a	0,070	0,189a	0,054	0,149y	0,020	0,169y	0,020
C20:4n6	1,815a	0,210	2,035a	0,310	2,346a	0,210	2,393y	0,880	1,738y	0,742
C20:5n3	0,000a	0,001	0,002a	0,002	0,011b	0,002	0,006y	0,002	0,003y	0,001
C22:6n3	0,017a	0,010	0,027a	0,010	0,037a	0,008	0,025y	0,011	0,028y	0,009
$\Sigma$ Saturado	43,955a	1,175	45,255a	0,806	40,807a	0,838	42,705y	1,296	44,971y	1,342
$\Sigma$ Insaturado	51,077a	0,980	52,368a	0,789	56,734b	0,854	53,979y	4,335	52,799y	4,779
$\Sigma$ Sat/Insat	0,861a	1,199	0,865a	1,021	0,720a	0,981	0,792y	0,299	0,852y	0,281
$\Sigma$ Omega 6	19,434a	0,500	20,970a	1,292	23,618a	0,341	22,938y	1,690	19,737y	1,620
$\Sigma$ Omega 3	2,127a	0,791	0,977a	0,782	2,082a	0,087	1,695y	0,453	1,762y	0,550
$\Sigma$ n6/n3	9,137a	0,632	21,464b	1,652	11,344ab	3,920	13,533y	3,731	11,202y	2,946

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

## Effect of illumination during the *in vitro* multiplication of *Limonium sinuatum*

### Efecto de la iluminación durante la fase de multiplicación *in vitro* de *Limonium sinuatum*

J. Sánchez<sup>1,2\*</sup>, A.A. Calderón<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria. Área de Fisiología Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena. España.

<sup>2</sup>Barberet & Blanc, S.A. by Dümen Orange. Puerto Lumbreras, Murcia. España.

\*jesus.tecnologia@hotmail.com

#### **Abstract**

Light plays an important role during the multiplication phase in the *in vitro* culture of *Limonium sinuatum*. Light intensity affects growth, multiplication rate and concentration of pigments in plants. This work presents the behavioural results of four *L. sinuatum* varieties of different colours, SN8946, SN9013, SN9000 and SN9001, subcultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with N<sup>6</sup>-benzyladenine (BA), and subjected to three light treatments. The incident photosynthetically active radiation (PAR) was measured for each of them, and the flow of photosynthetically active photons (PPF). Among the determinations made, measurements of plant growth and propagation rate were taken. Production and stem length were also measured during the greenhouse phase. The decrease in the distance between the light source and the plants did not have any negative effect on them. Thus, the reduction of the distance between trays within an *in vitro* culture chamber would lead to a better utilization of this, increasing the useful surface, and therefore, increasing the number of plants that would fit in it, without impairing the quality of the same.

**Keyword:** statice; light; micropropagation; production.

#### **Resumen**

La luz realiza una función importante durante la fase de multiplicación en el cultivo *in vitro* de *Limonium sinuatum*. La intensidad lumínica afecta al crecimiento, a la tasa de multiplicación y a la concentración de pigmentos de las plantas. Este trabajo presenta los resultados del comportamiento de cuatro variedades de *L. sinuatum* de diferentes colores, SN8946, SN9013, SN9000 y SN9001, subcultivadas en medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con N<sup>6</sup>-benziladenina (BA) en tres tratamientos de iluminación. Se midió para cada uno de ellos la radiación fotosintéticamente activa (PAR), cuantificando el flujo de fotones fotosintéticamente activos (FFF). Entre las determinaciones realizadas, se tomaron medidas del crecimiento de las plantas y de la tasa de propagación. También se midió la producción y la longitud del tallo durante la fase de cultivo en invernadero. La disminución de la distancia entre el foco emisor de luz y las plantas no tuvo ningún efecto negativo sobre estas. Así que, la reducción de la distancia entre bandejas dentro de una cámara de cultivo *in vitro*, llevaría a un mejor aprovechamiento de esta, aumentando la superficie útil, y por tanto, elevando el número de plantas que cabrían en ella, sin perjudicar la calidad de las mismas.

**Palabras clave:** limonio; luz, micropropagación; producción.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Limonium sinuatum* es especie muy valorada por el mercado tanto para flor seca como para flor en fresco. Esta planta pertenece a la familia de las Plumbagináceas.

La producción comercial de *Limonium* se realiza por semilla o esqueje, de forma que para obtener una planta se necesitan entre 6 y 8 meses, con rendimientos bajos (20-30%) [1] y en muchas ocasiones sin plantas homogéneas. Como alternativa se suele utilizar la propagación *in vitro* o micropropagación, que se realiza en laboratorio bajo condiciones controladas. La explotación comercial de estas técnicas requiere la optimización de una serie de parámetros. Entre los factores que se deben tener en cuenta se incluyen el método de establecimiento [2], la elección del método de cultivo, el ajuste de los medios de cultivo (nutrientes y hormonas) [3], la posible aparición de hiperhidricidad, etc.

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

En este trabajo se describe el ensayo realizado con cuatro variedades de limonio de diferentes colores, SN8946 (violeta), SN9013 (blanco), SN9000 (amarillo) y SN9001 (rosa), con el objetivo de conocer el efecto que tiene la intensidad lumínica aplicada durante la fase de multiplicación *in vitro*, sobre su desarrollo, tanto *in vitro* como *ex vitro*. Esto es importante, ya que uno de los problemas de los productores de plantas micropropagadas es la limitación de espacio dentro de las cámaras de cultivo, y, por este motivo, se busca reducir el espacio entre baldas en las estanterías utilizadas, manteniendo a la vez valores altos en los parámetros de producción y de calidad durante el cultivo en invernadero.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

Para realizar este ensayo se utilizó como material de partida brotes adventicios de plantas ya establecidas *in vitro* de las cuatro variedades arriba mencionadas. Las plantas habían pasado como mínimo por tres periodos de subcultivo en la fase de multiplicación.

En esta fase de multiplicación se usó un medio de cultivo MS modificado [4], suplementado con un 4 % (p/v) de sacarosa y N<sup>6</sup>-benziladenina (BA) a una concentración de 0,2 mg/L. Posteriormente, el pH se ajustó a 5,8 y se añadió agar a una concentración del 0,9 % (p/v). El medio se distribuyó en tubos de ensayo, los cuales se autoclavaron a 104 KPa y a 121 °C durante 20 min. Las plantas se mantuvieron 35 días a una temperatura de 22 °C, con una humedad relativa del 45-50%, una concentración de 700-800 ppm de CO<sub>2</sub> y un fotoperiodo de 16 h.

### 2.2 Tratamientos y análisis estadístico

Para estudiar el efecto de la distancia de la fuente emisora de luz se establecieron tres tratamientos dispuestos escalonadamente. En el T-1 (control) las plantas estaban situadas a 20 cm de distancia, en el T-2 y T-3 estaban a 16 cm y 11 cm, respectivamente. Esta distancia se midió desde el medio de cultivo de los tubos de ensayo hasta el tubo fluorescente. Se hizo una correlación entre la distancia al foco emisor y el flujo de fotones fotosintéticos (FFF) (Tabla 1), utilizando un luxómetro ECO LX1010B. Para los cálculos se usó un coeficiente obtenido de la empresa OSRAM para sus tubos fluorescentes modelo OSRAM L36W/865 Lumilux que permite realizar la conversión entre lux y FFF. Se cultivaron 20 plantas por variedad y tratamiento, y se llevaron a cabo tres repeticiones del ensayo. Al finalizar cada subcultivo se tomaron medidas del crecimiento y de la tasa de propagación. En la fase de cultivo en invernadero se midieron la

producción (tallos/planta) y la longitud del tallo (cm), determinando así la calidad agronómica y comercial. Todos los datos fueron estudiados con un análisis de la varianza (ANOVA) usando el programa IBM SPSS Statistics 20 con un nivel de significación  $\alpha=0,05$ .

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1 Crecimiento y tasa de multiplicación**

El crecimiento en las variedades SN8946 y SN9001 se vio ligeramente afectado por la cercanía al foco emisor de luz, disminuyendo un poco el T-3 con respecto al T-1 (Tabla 1). Sin embargo, para las otras dos variedades el T-3 fue el tratamiento donde el crecimiento aumentó ligeramente con respecto a T-1 y T-2, no mostrándose diferencias significativas entre casos.

En cuanto a la tasa de multiplicación, se observó que en todas las variedades se mantienen por encima de 1,20 brotes/planta y sin diferencias significativas entre tratamientos. Destacar que en la variedad SN9013 se podían ver diferencias significativas entre T-1 y T-2, pero no con T-3 que tendría un valor intermedio.

#### **3.2 Producción y parámetros de calidad**

La producción de las plantas de todas las variedades y tratamientos estuvo por encima de lo exigido (8 tallos/planta), mostrando la variedad SN9000 el valor más elevado, cercano a los 20 tallos por planta y corte (Figura 1). En las variedades SN9013, SN9000 y SN9001 no hubo diferencias significativas entre tratamientos. Sin embargo, el cultivar de color violeta presentó una producción ligeramente superior para el T-1 y con diferencias estadísticamente significativas respecto al T-2 y T-3.

En cuanto a la longitud del tallo todas las variedades y tratamientos presentaron datos que superaron el valor mínimo de 60 cm (Figura 2). Así, las variedades SN8946, SN9000 y SN9001 mostraron longitudes cercanas a los 70 cm, mientras que la variedad SN9013 produjo los tallos más largos superando los 80 cm. También cabe decir que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para las distintas variedades.

### **4. CONCLUSIONES**

Para la variedad SN8946 no se encuentran diferencias significativas entre tratamientos durante el desarrollo *in vitro*. Existen diferencias significativas en la producción entre T-1 y T-2. Respecto a la longitud se cumple con lo requerido. Por tanto, se podría usar el T-3 en esta fase.

La variedad SN9013 presenta un crecimiento similar para todos los tratamientos, pero hay diferencias en la tasa de multiplicación entre T-1 y T-2. Respecto a la calidad comercial, todos los valores están por encima de los valores deseados. Se usaría el T-3 en su subcultivo.

En las variedades SN9000 y SN9001, amarilla y rosa, respectivamente, no se ven diferencias significativas en el desarrollo *in vitro*. Además, como los parámetros de calidad para todos los tratamientos se mantienen de acuerdo a los valores exigidos, estas variedades se pueden pasar a subcultivar en las condiciones del T-3.

Cuando se pasa a utilizar el T-3 en lugar de T-1 se produce un mejor aprovechamiento de la cámara de cultivo, aumentando la superficie útil y número de plantas que cabrían. (Tabla 2).

### **5. AGRADECIMIENTOS**

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

## 6. REFERENCIAS

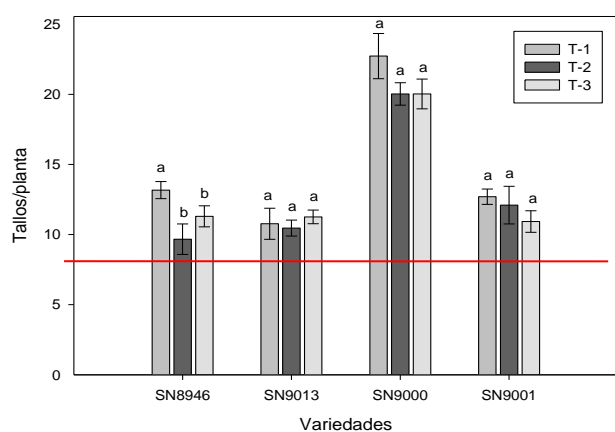
- [1] Fujita, M. 1993. Breeding and Cultivation: Statice (*Limonium*). (Seibunndo-Shinkosha Co. Ltd. Tokyo). Pp 136-150.
- [2] Igawa, T., Hoshino, Y. and Mii, M. 2002. Efficient plant regeneration from cell cultures of ornamental statice, *Limonium sinuatum* Mill. In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant. 38: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

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

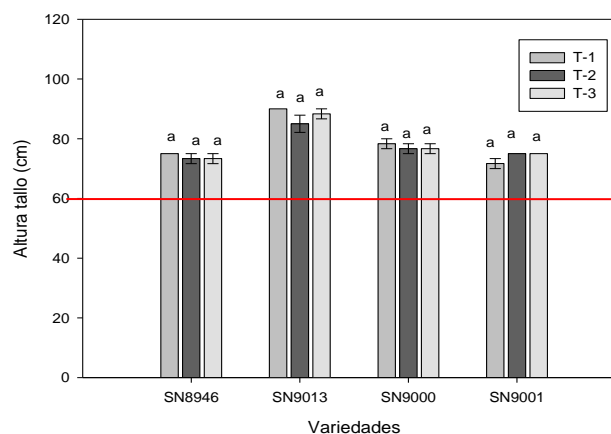
Variedad	Tratamiento	FFF ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ )	Crecimiento (cm)	Tasa de multiplicación (brotes/planta)
SN8946	T-1	96,2	5.96 $\pm$ 0.78a	1.25 $\pm$ 0.03a
	T-2	98,2	5.36 $\pm$ 0.37a	1.37 $\pm$ 0.06a
	T-3	100,2	5.01 $\pm$ 0.51a	1.25 $\pm$ 0.02a
SN9013	T-1	96,2	6.37 $\pm$ 0.44a	1.24 $\pm$ 0.05b
	T-2	98,2	6.21 $\pm$ 0.43a	1.47 $\pm$ 0.03a
	T-3	100,2	6.47 $\pm$ 0.94a	1.34 $\pm$ 0.01ab
SN9000	T-1	96,2	2.55 $\pm$ 0.35a	1.20 $\pm$ 0.06a
	T-2	98,2	2.16 $\pm$ 0.16a	1.25 $\pm$ 0.03a
	T-3	100,2	2.63 $\pm$ 0.31a	1.27 $\pm$ 0.04a
SN9001	T-1	96,2	4.47 $\pm$ 0.34a	1.21 $\pm$ 0.05a
	T-2	98,2	3.78 $\pm$ 0.95a	1.45 $\pm$ 0.10a
	T-3	100,2	3.76 $\pm$ 0.51a	1.35 $\pm$ 0.02a

**Tabla 2.** Optimización de la utilización de la cámara de cultivo.

Tratamiento	Superficie de la cámara de cultivo ( $\text{m}^2$ )	Distancia entre baldas (cm)	Superficie útil de la cámara de cultivo ( $\text{m}^2$ )	Capacidad de la cámara de cultivo (Nº de plantas)
T-1	56	34.5	97.5	63360
T-3	56	25.8	130.6	84480



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



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



# POSTER SESSION I:

## Food Technology and Engineering

## The anti-biofilm activity of essential oils against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis

## La actividad anti-biofilm de los aceites esenciales sobre *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Enteritidis

M. Somrani<sup>1,2\*</sup>, H. Debbabi<sup>2</sup>, F. Abidi<sup>3</sup>, A. Palop<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Ingeniería de los Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Universidad Politécnica de Cartagena, Spain.

<sup>2</sup>Institut National Agronomique de Tunis, Tunis, Tunisie.

<sup>3</sup>Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie, Tunis, Tunisie.

\*mariouma19081989@hotmail.com.

### **Abstract**

The presence of biofilms is common in food industry. Biofilms can exist on all types of surfaces in food plants ranging from plastic, glass, metal, wood, to food products. The attachment of the bacteria to the food product or the product contact surfaces leads to serious hygienic problems and economic losses due to food spoilage. In addition to that, biofilms persist on food contact surfaces. For these reasons, it is considered that the presence of biofilms in the food systems is a serious public health risk. Chemical products are not recommended because the bacteria can acquire resistance, which lead to a significant increase in the number of microbial strains becoming resistant. Therefore, it is important to investigate the use of natural products (essential oils), known for their antimicrobial activity, in order to control biofilm development by foodborne pathogens.

**Keywords:** food; attachment; foodborne pathogens.

### **Resumen**

La presencia de biofilms es habitual en la industria alimentaria. Los biofilms pueden presentarse en todo tipo de superficies de las plantas de procesamiento de alimentos, desde plásticos, vidrio, metal o madera, hasta los propios alimentos. La fijación de las bacterias a los alimentos o a las superficies conduce a serios problemas higiénicos y pérdidas económicas debidas a la alteración de alimentos. Además, los biofilms persisten en las superficies en contacto con los alimentos. Por estas razones, se considera que la presencia de biofilms en los sistemas alimentarios constituye un riesgo grave para la salud pública. El uso de productos químicos no está recomendado ya que las bacterias pueden desarrollar resistencia a los mismos, que puede llevar a un aumento significativo del número de cepas microbianas con resistencia adquirida. Así pues, resulta conveniente investigar el uso de productos naturales (aceites esenciales), conocidos por su actividad antimicrobiana, para el control de los biofilms causados por microorganismos patógenos.

**Palabras clave:** Alimentos; adhesión; patógenos alimentarios.



## 1. INTRODUCTION

*Listeria monocytogenes* is a Gram positive bacterium that is commonly present in the environment, and also in food processing facilities [1, 2]. It is a foodborne pathogen of a particular concern because of its high mortality rate. It can be found in many raw foods such as fruits, vegetables and meats as well as processed food [2]. Also, it is a serious problem in the processing facilities because it forms biofilms, which are difficult to dislodge during cleaning [3]. Among the most virulent foodborne pathogens are also *Salmonella* spp that can attach and form biofilms on surfaces found in food-processing plants including plastic, cement, and stainless steel [4,5].

Biofilms formed on processing surfaces in food industry have always been a major cause for food spoilage and contamination [6], although their importance has only been recognized quite recently. They are an association of microorganisms in which microbial cells adhere to each other within a self-produced matrix of extracellular polymeric substance mainly composed of polysaccharides [7]. In order to control biofilms, several strategies have been developed to prevent food contamination and spoilage, such as cleaning-in-place (CIP), disinfection by physical processes, and chemical-based decontamination [8]. Unfortunately, chemical products have been ineffective to eradicate biofilms because the excessive use of disinfectant agents to remove them allowed microorganisms to acquire resistance, which led to a sharp and dangerous increase in the number of microbial strains [9]. So, it is necessary to look for new alternatives that are natural, effective and unable to generate resistance. Essential oils have always been among the best options to choose as they have been generally recognized as safe (GRAS) [10]. Bacteria included in biofilm structure are generally more resistant to antimicrobial agents than planktonic cells which make the issue even more serious [11]. Therefore, the aim of this study is to investigate, the anti-biofilm effect of essential oils on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Bacterial culture

*Listeria monocytogenes* CECT 4032 and *Salmonella enteric* serovar Enteritidis CECT 4300 will be used in this study and will be provided by the Spanish Type Culture Collection (CECT, Valencia, Spain).

### 2.2 Essential oils

Essential oils of onion, garlic, cinnamon, geranium and clove will be used and will be dissolved in 95% v/v ethanol. Onion, garlic and cinnamon essential oils will be provided by Iberchem (Murcia, Spain). Geranium and clove essential oils will be obtained from Tunisia.

### 2.3 Agar disk diffusion assay

The test will be performed, following the procedure described by [12]. 100 µL bacterial inoculum of approximately  $1-2 \times 10^8$  CFU/mL will be applied to the surface of a Brain Heart Infusion agar plate (BHIA; Scharlau Chemie, Barcelona, Spain). Then, 3 sterile disks of 6 mm (BD sensi-disc, Becton Dickinson GMBH Heidelberg) will be placed on the inoculated agar surface. One will be impregnated with 20 µL of essential oil, the other with ethanol (negative control) and the last one with erythromycin (7.5 µg / disc; positive control; Duchefa Biochemie. The Netherlands). The plates will then be incubated for 24 h at 37°C prior to determination of results. Finally, the zones of growth inhibition around each of the disks will be measured in mm.

### 2.4 Determination of minimal inhibitory concentration (MIC)

This procedure described by [13], involves preparing two-fold dilutions of essential oils ranging from 0.2 mg/mL until 0.00625 mg/mL in 5 mL of Tryptic Soy Broth (TSB; Scharlau Chemie) liquid growth medium dispensed in test tubes. The essential oil-containing tubes will

then be inoculated with a 0.1 mL standardized bacterial suspension of 10<sup>6</sup> CFU/mL. Following overnight incubation at 37°C, the tubes will be examined for visible bacterial growth as evidenced by turbidity. The lowest concentration of essential oil that prevents growth represents the minimal inhibitory concentration (MIC).

### 2.5 Inhibition of initial cell attachment

The method was adopted by [14]. Therefore, solutions of antimicrobials (equivalent to 0.5 MIC, 1 MIC and 2 MIC) will be prepared. 100 µL of each solution will be added to the flat-bottom 96-well polystyrene microtiter plates, and equal volumes of ethanol and erythromycin will be added as negative and positive controls, respectively. A standardized culture of 10<sup>6</sup> CFU/mL will be added into the wells in order to achieve 200 µL as a final volume in each well. The cultures will be added into the wells in triplicate, and sterile TSB will be added as an additional control to guarantee the sterility of the medium during the experiment. The plates will be sterile sealed and incubated at 37°C for 24 h to allow cell attachment and biofilm formation. After one night incubation, the modified crystal violet assay [16] will be performed to assess biofilm biomass, and the results will be expressed as percentage inhibition (Eqn 1).

Percentage inhibition =  $[(\text{OD Negative control} - \text{OD Experimental}) / \text{OD Negative control}] * 100$

### 2.6 Inhibition of preformed biofilm

Biofilms will be allowed to form for 6 h before adding the essential oils on the microtiter plates, by pipetting 100 µL of standardized culture of 10<sup>6</sup>CFU/mL into selected wells of the microtiter plate in triplicate and incubating them for 6 hours at 37°C, allowing the biofilm to be formed. Then, 100 µL of each stock solution of the essential oils will be added to each well to achieve a final volume of 200 µL. Equal volumes of ethanol and erythromycin will be added as negative and positive controls respectively. After the treatment of preformed biofilms with antimicrobials, the plates will be incubated over a series of time intervals (1, 5 and 20 h). At each time interval, biofilm biomass will be measured using the crystal violet assay [15].

### 2.7 Biofilm biomass (Crystal violet assay)

For the cell attachment assessment (Section 2.5) and the 1 h, 5 h and 20 h incubation (Section 2.6), culture medium from each well will be gently removed and the plates will be washed five times with sterile distilled water to remove planktonic bacteria. They will then be air-dried for 45 min. Afterwards, 100 µL of 1% crystal violet will be added to each well to stain the adherent bacteria. Microtiter plates will then be incubated at room temperature for 45 min to allow staining. Each microtiter plate will then be washed five times with distilled water, shaking out as much liquid as possible in order to remove the crystal violet solution. This step will remove any crystal violet that is not specifically staining the adherent bacteria. 125 µL of 95% ethanol will then be added to the wells to destain the wells, allowing the dye to solubilize by covering plates and incubating them for 10 to 15 min at room temperature. 100 µL of the destaining solution from each well will then be transferred to a new plate, and the absorbance will be measured at 595 nm using a microplate reader (Bioscreen C; Lab Systems, Helsinki, Finland). The mean absorbance (OD<sub>595 nm</sub>) will be used for determining the percentage inhibition of biomass formation for each concentration of antimicrobial according to the equation mentioned above in section 2.2

### 2.8 Statistical treatment of the data

All experiments will be performed at least in triplicate. ANOVA test will be performed to ascertain the statistical significance of the data.

### 3. EXPECTED RESULTS

Essential oils should have more effect on the initial cell attachment than on preformed biofilm because once the biofilm is formed, bacteria present in it have more chance to survive stress conditions.

If the results found are promising, the identification of the bioactive components in the essential oils would allow the inclusion of these compounds in novel disinfectant and sanitizer formulations

### 4. ACKNOWLEDGEMENT

This research will be financially supported, initially, by the Ministry of Economy and Competitiveness of the Spanish Government and European Regional Development Fund (ERDF) through project AGL2013-48993-C2-1-R.

### 5. REFERENCES

- [1] Arevalos-Sánchez M., Regalado C., Martín SE., Domínguez-Domínguez J., García-Almendárez BE. 2012. Effect of neutral electrolyzed water and nisin on *Listeria monocytogenes* biofilms, and on listeriolysin O activity. *Food Control* 24: 116-122.
- [2] RasaviRohani S.M., Moradi M., Mehdizadeh T., Saei-Dehkordi S.S., Griffiths M. 2011. The effect of nisin and garlic (*Allium sativum* L.) essential oil separately and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Sci. Technol.* 44: 2260-2265.
- [3] Harvey J., Keenan K.P., Gilmour A. 2007. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiol.* 24: 380-392.
- [4] Joseph B., Otta S.K., Karunasagar I. 2001. Biofilm formation by *Salmonella spp.* on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *Int J. Food. Microbiol.* 64: 367-372.
- [5] Chmielewsky R.A.N., Frank J.F. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Compr. Rev. Food. Sci. Food Saf.* 2: 22-32.
- [6] Dhayakaran A.R.P., Neethirajan S., Xue S., Shi J. 2015. Characterization of antimicrobial efficacy of soy isoflavones against pathogenic biofilms. *Food. Sci. Technol-LEB.* 63: 859-865.
- [7] Gilmartin N., Gíao M.S., Keevil C.W., O'Kennedy R. 2016. Differential internalinA levels in biofilms of *Listeria monocytogenes* grown on different surfaces and nutrient conditions. *Int. J. Food. Microbiol.* 219: 50-55.
- [8] Srey S., Jahid I.K., Ha S. D. 2013. Review: biofilm formation in food industries. *Food Control* 31: 572-585.
- [9] Weng X., Van Niekerk J., Neethirajan S., Warriner K. 2016. Characterization of antimicrobial efficacy of photocatalytic polymers against food-borne biofilms. *Food Sci. Technol.* 68: 1-7.
- [10] Food and Drug Administration. 2005. GRAS notifications. < <http://www.fda.gov> > Retrieved 28.06.10.
- [11] Donlan R.M., Costerton J.W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 167-193.
- [12] Djenane D., Yangüela J., Montañés, L., Djerbal M., Roncalés P. 2011. Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food Control* 22: 1046-1053.
- [13] Balouiri M., Sadiki M., Koraichi Ibn souda S. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* 6: 71-79.
- [14] Sandasi M., Leonard C. M., Viljoen A.M. 2010. The *in vitro* antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 50: 30-35.
- [15] Djordjevic D., Wiedmann M., McLandsborough LA. 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2950-2958.

## Optimization of packaging and refrigerated preservation of fresh sea bream (*Sparus aurata*) from aquaculture, intact and in fillets

## Optimización del envasado y conservación refrigerada de la dorada (*Sparus aurata*) fresca de acuicultura, entera y fileteada

L. Navarro-Segura<sup>1\*</sup>, M. Ros-Chumillas<sup>1</sup>, A. López-Gómez<sup>1</sup>

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

\*laura.navarro@upct.es

### **Abstract**

The consumption of fresh sea bream (*Sparus aurata*), intact and in fillets, has been increased in recent years. However, the shelf life of these products is relatively short. Therefore, the aim of this research will be the optimization of packaging and refrigerated preservation of whole and filleted fresh sea bream, in order to improve its quality and shelf life. To this end, new decontamination systems using essential oils (EOs) will be applied to the whole and filleted sea bream, before and during modified atmosphere packaging (MAP), and in combination with ultra-clean conditions of packaging. New surface decontamination systems applying nanoemulsion and/or vapors of EOs will be studied in fillets MAP packaging, in order to decrease and control the initial microbial load and extending its refrigerated shelf life. Also, a new packaging system with antimicrobial ice using EOs forming inclusion complex with  $\beta$ -cyclodextrins will be studied in the case of intact sea bream packaging in polystyrene boxes.

**Keywords:** quality; active packaged; shelf life; essential oils.

### **Resumen**

La demanda de dorada fresca (*Sparus aurata*), entera y fileteada, se ha incrementado en estos últimos años. Sin embargo, la vida útil de estos productos es relativamente corta. Así, el objetivo de esta investigación será la optimización del envasado y de la conservación refrigerada de la dorada fresca entera y fileteada, con el fin de mejorar su calidad y vida útil. Para ello, se usarán nuevas técnicas de descontaminación con aceites esenciales (EOs) en dorada entera y fileteada, antes y durante el envasado en atmósfera modificada (MAP), y en combinación con envasado en condiciones ultralimpias. Se estudiarán nuevos sistemas de descontaminación superficial en filetes de dorada aplicando nanoemulsión y/o vapores de EOs con envasado MAP, con el fin de disminuir la carga microbiana inicial y extender su vida útil en refrigeración. Además, se estudiará un nuevo sistema de envasado con hielo antimicrobiano usando EOs formando un complejo de inclusión con  $\beta$ -ciclodextrinas para el envasado de dorada entera en cajas de poliestireno.

**Palabras clave:** calidad; envase activo; vida útil; aceites esenciales.

## 1. INTRODUCCIÓN

La dorada (*Sparus aurata*) es una de las especies de acuicultura más importantes en los países mediterráneos. Además, su producción se ha visto incrementada durante la última década debido a la demanda de dorada fresca por los consumidores gracias a su apreciado sabor y buena calidad [1]. Debido a que la sociedad ha experimentado cambios en su estilo de vida, por trabajo, hábitos alimenticios y poca disponibilidad de tiempo, los consumidores están demandando a la industria nuevos productos alimenticios que no sólo necesiten el mínimo de preparación y tiempo de cocinado, sino también que sean saludables y apetecibles. En este sentido, el consumo de pescado en filetes ha aumentado desde hace algunos años y, según los estudios de tendencia, seguirá aumentando en el futuro [2].

Por otro lado, es sabido que la vida útil de la dorada (entera o fileteada) de acuicultura es relativamente corta en refrigeración, aunque mediante el envasado en atmósfera modificada (MAP) se puede aumentar significativamente la vida útil (hasta 12-14 días en pescado fileteado) [2]. Pero, esta vida útil se puede aumentar mediante el uso de sistemas de envasado activo antimicrobiano [3,4] y mediante técnicas que disminuyan la carga microbiana inicial en el producto envasado, como la descontaminación previa al envasado, envasado ultralimpio, y uso de tratamientos suaves de descontaminación, aunque puedan ocasionar un cierto procesado mínimo (o efecto de cocción), como es el caso del tratamiento con altas presiones [5,6].

Como tecnologías emergentes se están utilizando cada vez más los conservantes naturales, como son los aceites esenciales. Éstos son metabolitos secundarios de plantas naturales y son generalmente reconocidos como seguros (GRAS). Según estudios recientes los aceites esenciales han demostrado tener un gran efecto antimicrobiano y antioxidante sobre alimentos comerciales, entre ellos, el pescado [7].

La investigación en el uso de estos aceites naturales como antimicrobianos debe centrarse en desarrollar nuevas técnicas de aplicación como nanoemulsiones y/o vapores sobre los alimentos que permitan la reducción de la dosis administrada, ya que su problemática reside en que a dosis relativamente altas pueden producir cambios sensoriales indeseables [8, 9]. Los tratamientos aplicados tanto con nanoemulsiones como con vapores de aceites esenciales han tenido resultados efectivos contra gran variedad de microorganismos debido a sus excelentes propiedades antimicrobianas [8].

El objetivo de esta investigación se centrará fundamentalmente en la mejora integral de la calidad de dorada (*Sparus aurata*) fresca de acuicultura en sus formatos entero y fileteado, y conservados en refrigeración, así como en el aumento de la vida útil de estos productos, combinando la mejora de la calidad inicial del producto y la mejora del sistema de envasado mediante un sistema innovador de envasado activo antimicrobiano en condiciones ultralimpias. Este aumento de la calidad y extensión de vida útil de los productos refrigerados implicará un aumento del valor añadido de la dorada de acuicultura, que ayudará a competir en el mercado internacional de este tipo de pescado.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Las determinaciones que se realizarán en dorada fresca, tanto entera como fileteada, se detallan en los siguientes subapartados.

### 2.1 Parámetros físico-químicos

Los parámetros a evaluar tanto en dorada entera como en fileteada se describen a continuación:

2.1.1 pH. Para evaluar el pH se utilizará un pH-metro Basic 20, Crison. Este parámetro se determinará debido a que está altamente relacionado con la vida útil del pescado.

2.1.2 Color. La determinación de color en pescado se realizará mediante un colorímetro con el que, según el sistema CIELAB de espacio de color, se obtendrán: la luminosidad ( $L^*$ ), las coordenadas rojo/verde ( $a^*$ ) y las coordenadas amarillo/azul ( $b^*$ ).

2.1.3 Textura. Para la determinación de este parámetro se utilizará un texturómetro TA-XT plus (Stable Micro Systems). El análisis de perfil de textura (TPA) se realizará con una sonda cilíndrica de compresión de 50 mm de diámetro y los resultados se analizarán en base al comportamiento mecánico del alimento según las características dureza, elasticidad, cohesividad, gomosidad, masticabilidad y adhesividad. Los parámetros de textura se analizarán según Bourne [10].

2.1.4 Capacidad de retención de agua (CRA). Se determinará el porcentaje de agua que queda retenida en el músculo de pescado, para ello se determinará el agua libre que queda en el mismo. La técnica para la determinación de la capacidad de retención de agua será la descrita por Grau y Hamm [11].

2.1.5 Nitrógeno de trimetilamina (N-TMA). Se utilizará el método propuesto por Dyer. La extracción de trimetilamina (TMA) se realizará con ácido tricloroacético, y se hará reaccionar con ácido pícrico para formar un compuesto coloreado cuya intensidad es proporcional a la concentración de TMA. La determinación se realizará midiendo con espectrofotómetro a 410 nm.

## 2.2 Determinación microbiológica

Para el análisis microbiológico, 25 g de muestra se diluirán en 225 mL de agua peptonada (Scharlau, Barcelona) en bolsas estériles de Stomacher para ser homogeneizadas en Stomacher durante 1 minuto. Alícuotas apropiadas se sembrarán en placas Petri y los análisis se realizarán por duplicado. Los microorganismos alterantes del pescado que se estudiarán son: areobios mesófilos y psicrófilos totales, bacterias ácido lácticas, *Enterobacteriaceae spp*, y *Pseudomonas ssp*.

## 2.3 Análisis sensorial

El análisis sensorial se evaluará tanto en dorada fresca como cocinada usando el método Quality Index Method (QIM) descrito por Cárdenas-Bonilla y Ozogul [12,13].

## 2.4 Estudio estadístico

Se realizará un análisis estadístico mediante, el paquete estadístico R, versión 3.2.3, así como análisis de varianza (ANOVA), teniendo en cuenta un nivel de significación  $p < 0.05$ .

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esta investigación servirá para mejorar la calidad y la vida útil de los productos frescos de dorada de acuicultura, y desarrollar nuevos productos mínimamente procesados que se espera que tengan una buena aceptación en el mercado (ya que se tiene conocimiento de la existencia de la demanda de estos nuevos productos).

Se espera desarrollar un nuevo proceso de envasado del pescado fresco entero o fileteado en condiciones ultralimpias, con descontaminación previa mediante aplicación de nanoemulsiones de aceites esenciales y envasado activo antimicrobiano en atmósfera modificada (MAP) con vapores de aceites esenciales en filetes de dorada para conseguir disminuir la carga microbiana inicial, mejorar las características fisicoquímicas y sensoriales, y aumentar su vida útil en refrigeración.

Además, se estudiará un novedoso sistema de envasado de dorada entera en cajas de poliestireno aplicando hielo antimicrobiano con aceites esenciales encapsulados en  $\beta$ -ciclodextrinas como conservante. Así se espera alargar la conservación en refrigeración del pescado sin alteración alguna de su aspecto ni calidad sensorial.

#### 4. CONCLUSIONES

Se espera conseguir un producto de dorada entero o fileteado refrigerado con mayor calidad y vida útil, mediante la optimización de los sistemas de envasado y conservación. Además, se espera que estos productos tengan una gran aceptación entre los consumidores por su mayor valor añadido.

#### 5. AGRADECIMIENTOS

Se quiere agradecer a la empresa Pescados de Acuicultura de Murcia S.L. (Pescamur) por su contribución en esta investigación que forma parte del Proyecto de I+D financiado por el CDTI. También agradecer al Instituto de Biotecnología Vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena (IBV-UPCT) por prestar sus instalaciones en la realización de estos trabajos.

#### 6. REFERENCIAS

- [1] Alasalvar C., Taylor K.D.A., Öksüz A., Garthwaite T., Alexis M.N., Grikorakis K. 2001. Freshness assessment of cultured sea Bream (*Sparus aurata*) by chemical, physical and sensory methods. *Food Chem.* 72: 33-40.
- [2] Garrido M.D., Hernández M.D., Espinosa M.C., López M.B. 2014. Enhanced quality characteristics of refrigerated seabream (*Sparus aurata*) fillets packed under different systems (Modified atmosphere vs Vacuum). *J Aquat Food Prod T.* 25: 156-168.
- [3] Attouchi M., Sadok S. 2012. The effects of essential oils addition on the quality of wild and farmed sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. *Food Bioprocess Tech.* 5(5): 1803-1816.
- [4] Küçükgülmez A., Kadak A.E., Gökçin M. 2013. Antioxidative and antimicrobial activities of shrimp chitosan on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) during refrigerated storage. *Int J Food Sci Tech.* 48(1): 51-57.
- [5] López-Gómez A., Fernández P.S., Palop A., Periago P.M., Martínez-López A., Marín-Iniesta F., Barbosa-Cánovas G.V. 2009. Food safety engineering: an emergent perspective. *Food Eng Rev.* 1(1): 84-104.
- [6] López-Gómez A., Castaño-Villar A.M., Palop A., Marín-Iniesta F. 2013. Hygienic design and microbial control of refrigeration and air conditioning systems for food processing and packaging plants. *Food Eng Rev.* 5(1): 18-35.
- [7] Baydar, H., Sagdic, O., Ozkan, G., Karadogan, T. 2004. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control.* 15:169-172.
- [8] Zhang, Z., Vriesekoop, F., Yuan, Q., Liang, H. 2014. Effects of nisin on the antimicrobial activity of D-limonene and its nanoemulsion. *Food Chem.* 150:307-312.
- [9] Inouye, S., Takizawa, T., Yamaguchi, H. 2001. Antibacterial activity of essential oils and the major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J Antimicrob Chemother.* 47: 565-573.
- [10] Bourne M.C. 1978. Texture profile analysis. *Food Technol.* 32: 62-72.
- [11] Grau, R., Hamm, R. 1953. Eine einfache Methode zur Bestimmung der Wasserbindung im Muskel. *Naturwissenschaften.* 40(1): 29-30.
- [12] Cardenas-Bonilla A., Sveinsdottir K., Martinsdottir E. 2007. Development of Quality Index Method (QIM) scheme for fresh cod (*Gadus morhua*) fillets and application in shelf life study. *Food Control.* 18 (4): 352-358.
- [13] Ozogul, I., Polat, A., Özogul, Y., Boga, E.K., Ozogul, F., Ayas, D. 2014. Effects of laurel and myrtle extracts on the sensory, chemical and microbiological properties of vacuum-packed and refrigerated European eel (*Anguilla anguilla*) fillets. *Int. J. Food Sci Technol.* 49: 847-853.

## New biotechnological processes for manufacturing scFOS in the liquid sugar industry

## Nuevos procesos biotecnológicos de fabricación de scFOS en la industria de azúcares líquidos

M.J. Sánchez-Martínez<sup>1\*</sup>, S. Soto-Jover<sup>1</sup>, A. López-Gómez<sup>1</sup>

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

\*mjose.sanchez@upct.es

### **Abstract**

Fructooligosaccharides (FOS) are oligosaccharides consisting of linear chains of  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1)-linked fructose with a terminal D-glucose. The short chain FOS (scFOS) have character prebiotic, so they are interesting food ingredients. The scFOS production can be performed by hydrolysis of inulina or by polymerization using fructosyltransferases (FTase) enzymes. The FTases are mainly produced from fungi, such as *Penicillium* sp, and *Aspergillus* sp., among others. Some of these enzymes are marketed but not for manufacturing scFOS because of its relatively high price. In this work, new sources (fungi) and technologies for obtaining FTase enzymes, and producing scFOS, will be studied at laboratory and bioreactor scales, for industrial production of scFOS in two stages of submerged fermentation (SmF): a first SmF step for production of FTase from the selected mould, and a second SmF step for obtaining scFOS by enzymatic fermentation, from these FTases produced in sucrose solution.

**Keywords:** fructooligosaccharides; fungi fructosyltransferase production; Two stages; SmF.

### **Resumen**

Los fructooligosacáridos (FOS) son oligosacáridos que consisten en cadenas lineales de D-fructosa con enlaces  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1), que presentan una molécula de D-glucosa terminal. Los FOS de cadena corta (scFOS) tienen carácter prebiótico por lo que son interesantes como ingredientes alimentarios. La producción de scFOS se puede realizar mediante hidrólisis de inulina o mediante polimerización a partir de enzimas fructosiltransferasas (FTasas). Las FTasas se producen sobre todo a partir de hongos, como *Aspergillus* sp., y *Penicillium* sp., entre otros. Algunas de estas enzimas FTasas están presentes en el mercado, aunque no para fabricar scFOS porque presentan un precio relativamente elevado. Por ello, en este trabajo se estudiarán, a escala de laboratorio y biorreactor, nuevas fuentes (hongos) y tecnologías de producción de FTasas y de scFOS, para conseguir una producción industrial de scFOS mediante fermentación sumergida en dos etapas (SmF): una primera etapa SmF para la producción de FTasas a partir del hongo y una segunda etapa SmF de producción de scFOS a partir de estas FTasas en una solución de sacarosa.

**Palabras clave:** fructooligosacáridos; producción de fructosiltransferasa de hongos; dos etapas; SmF.



## 1. INTRODUCCIÓN

El consumo de alimentos y bebidas funcionales que contienen prebióticos y probióticos se ha convertido en una fuerte tendencia de mercado a nivel mundial. En particular, desde hace ya algunos años, la industria alimentaria está explotando todas las posibilidades de adición de fructooligosacáridos de cadena corta (scFOS) a alimentos y bebidas [5,8]. Estos fructooligosacáridos producen efectos beneficiosos en la salud debido a que son fibra dietética y además tienen un efecto prebiótico [9].

Los scFOS son carbohidratos no digeribles, que tienen un grado de polimerización menor que 9 y están químicamente compuestos por cadenas lineales de D-fructosa unidas entre sí mediante enlaces  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1), con una molécula de D-glucosa terminal unida a una fructosa por un enlace  $\alpha$  (2 $\rightarrow$ 1) [7]. Los scFOS más representativos son 1-kestosa (GF2, o DP3), 1-nistosa (GF3; o DP4), y 1F-fructofuranosilnistosa (GF4, o DP5) [2,4]. Existen dos vías principales para la producción de FOS. Por un lado, está la producción de FOS mediante la hidrólisis de la inulina. Y por otro lado, está la síntesis enzimática de FOS que se lleva a cabo por transfructosilación de sacarosa a través de la ruptura de los enlaces glucosídicos  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) y la transferencia de la fracción fructosil a cualquier aceptor que no sea agua, como sacarosa o un fructooligosacárido. La principal enzima usada en esta síntesis enzimática es la fructosiltransferasa (FTasa), que se obtiene principalmente de fuentes fúngicas [2,6,10]. Por ejemplo, la actividad fructosiltransferasa de enzimas obtenidas a partir de diferentes especies de *Aspergillus* da lugar a una transformación de hasta el 61% de la sacarosa en scFOS [1].

Actualmente no existen enzimas en el mercado para la producción específica de scFOS (con actividad FTasa), pero en la bibliografía existen estudios de preparados enzimáticos comerciales destinados a otros fines que presentan actividad de transfructosilación, obteniendo altos rendimientos de producción de scFOS a partir de sacarosa, pero estas enzimas presentan un alto precio de mercado.

La fabricación industrial de FOS tiene lugar mediante fermentación sumergida en dos etapas (SmF). Una primera etapa para la producción y purificación de los enzimas FTasas a partir del hongo y una segunda etapa de producción de scFOS a partir de estos enzimas FTasas en una solución de sacarosa. Pero, también se puede llevar a cabo la producción de scFOS en una sola etapa, obteniendo buenos rendimientos de producción de scFOS [3, 11, 12]. Por ello, se están llevando a cabo diversos estudios sobre la producción de scFOS, con el objetivo de conseguir procesos de producción más eficaces, con mejores rendimientos de producción de scFOS, y menores costes. El aumento de la productividad se puede lograr mediante el uso de diferentes métodos fermentativos y diferentes sustratos y fuentes microbianas de enzimas productoras de FOS, así como la optimización de las condiciones de cultivo [4].

En este trabajo se pretende estudiar, por un lado, nuevas fuentes fúngicas de enzimas con actividad FTasa y, por otro lado, la producción de scFOS mediante SmF, así como los factores que determinan su rendimiento y los costes de su producción.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Producción de enzimas con actividad de transfructosilación a partir de fuentes fúngicas.

En primer lugar se realizará una selección de cepas fúngicas con producción de enzimas con actividad FTasa. Una vez las cepas estén seleccionadas se incubarán en un medio de cultivo apropiado para cada microorganismo, con el objetivo de conseguir la mayor producción de enzimas, extracelulares e intracelulares, bajo condiciones de temperatura, aireación y agitación controladas. Transcurrido el tiempo necesario se realizará la separación de los enzimas intracelulares y extracelulares mediante procesos de filtración y centrifugación para el posterior

uso de los enzimas en la segunda etapa. Estos estudios se llevarán a cabo a escala de laboratorio (en matraz de 250 mL) y a escala de biorreactor de 7 L.

### 2.2 Producción de scFOS a partir de los enzimas con actividad FTasa obtenidos de fuentes fúngicas.

La producción de FOS tendrá lugar mediante una fermentación enzimática SmF, a partir de enzimas con actividad FTasa obtenidos del cultivo de diferentes hongos, en una solución concentrada de sacarosa, bajo condiciones de temperatura, pH y agitación controlados, durante un tiempo suficiente para el máximo consumo de la sacarosa inicial y la mayor producción de scFOS. Estos estudios se llevarán a cabo a escala de laboratorio (en matraz de 250 mL) y a escala de biorreactor de 7 L.

### 2.3 Determinación de la cinética de los procesos de fermentación enzimática. Análisis de los azúcares simples y scFOS producidos.

Para la determinación de azúcares simples y FOS de cadena corta se utilizará un Cromatógrafo UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) con detector de índice de refracción. Estos estudios se llevarán a cabo a escala de laboratorio (en matraz de 250 mL) y a escala de biorreactor de 7 L.

## **3. RESULTADOS**

Se pretende estudiar todas las enzimas comerciales con actividad FTasa que puedan tener uso interesante para la producción de scFOS a escala industrial, y mediante fermentación SmF. También, se tratará de encontrar un hongo con gran capacidad de producción de enzimas con actividad FTasa, con un alto rendimiento de transformación de la sacarosa en scFOS en fermentación SmF. Además se optimizarán todas las variables que afectan a la producción de los enzimas FTasas, así como a la producción de scFOS por fermentación SmF, obteniendo el mayor rendimiento de producción de scFOS (aproximadamente del 60%), con un coste adecuadamente bajo. Se quieren obtener resultados adecuados a escala de laboratorio (matraz de 250 mL), que permitan realizar el escalamiento a biorreactor de 7 L, y luego a 12 L, para extraer datos que permitan la fabricación de scFOS a escala industrial, con las FTasas seleccionadas y producidas, y con procesos y costes optimizados.

## **4. 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.

## **5. REFERENCIAS**

- [1] Fernández-Arrojo L., Álvaro M., Ghazi I., De Abreu M., Linde D., Gutiérrez-Alonso P., Fernández-Lobato M. 2007. On the transfructosylation activity and selectivity of microbial  $\beta$ -fructofuranosidases for the production of prebiotics. *J Biotechnol.* 131(2): S107.
- [2] Crittenden R.G., Playne, M. 1996. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends Food Sci Tech.* 7(11): 353-361.
- [3] Domínguez A., Nobre C., Rodrigues L.R., Peres A.M., Torres D., Rocha I., Teixeira J. 2012. New improved method for fructooligosaccharides production by *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydr poly.* 89(4): 1174-1179.

- [4] Dominguez A.L., Rodrigues L.R., Lima N.M., Teixeira J.A. 2014. An overview of the recent developments on fructooligosaccharide production and applications. *Food Bioprocess Tech.* 7(2): 324-337.
- [5] Flores-Maltos D.A., Mussatto S.I., Contreras-Esquivel J.C., Rodríguez-Herrera R., Teixeira J.A., Aguilar C.N. 2016. Biotechnological production and application of fructooligosaccharides. *Crit. Rev. Biotechnol.* 36(2): 259-267.
- [6] Ganaie M.A., Gupta U.S., Kango N. 2013. Screening of biocatalysts for transformation of sucrose to fructooligosaccharides. *J. Mol. Catal B- Enzym.* 97, 12-17.
- [7] Niness K. 1999. Breakfast foods and the health benefits of inulin and oligofructose. *Cereal Foods World.* 44(2): 79-81.
- [8] Renuka B., Kulkarni S. G., Vijayanand P., Prapulla, S.G. 2009. Fructooligosaccharide fortification of selected fruit juice beverages: Effect on the quality characteristics. *LWT-Food Sci. Technol.* 42(5): 1031-1033.
- [9] Rubio C., Latina C., Navarro A. 2012. Producción de fructooligosacáridos por invertasa de *Aspergillus niger* IB56: un prebiótico de importancia para la salud humana y animal. *Boletín Microbiológico.* 27(1).
- [10] Saad N., Delattre C., Urdaci M., Schmitter J.M., Bressollier P. 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT-Food Sci. Technol.* 50(1): 1-16.
- [11] 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.
- [12] Vega-Paulino R.J., Zúniga-Hansen M.E. 2012. Potential application of commercial enzyme preparations for industrial production of short-chain fructooligosaccharides. *J. Mol. Catal. B- Enzym.* 76, 44-51.

New cardboard active tray based on nanoencapsulated essential oils in  $\beta$ -cyclodextrins. Optimization of the industrial manufacturing process.

Nuevo envase de cartón activo basado en el uso de aceites esenciales nanoencapsulados en  $\beta$ -ciclodextrinas. Optimización de su fabricación industrial.

J. Grande-Finch<sup>1\*</sup>, A. Iguaz-Gainza<sup>1</sup>, A. López-Gómez<sup>1</sup>

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

\*jesus.grande@gmail.com

### **Abstract**

It is necessary to advance in antimicrobial active packaging technology for fresh fruits and vegetables. In this way, it will be possible to reach a more differentiated quality and shelf-life against competitors, with particular emphasis on improving their microbiological quality and food safety. Therefore, the main objective of this project is to obtain -at industrial scale- a new cardboard tray with antimicrobial properties, which significantly increases the shelf life of the product, as well as guarantee food safety. For this, essential oils nanoencapsulated in  $\beta$ -cyclodextrins are incorporated as coating on the package surface. In addition, the physical properties of this new packaging will be optimized, so that it can be manufactured optimally at industrial scale, responding to the necessary mechanical specifications. The physical properties of the coating solution and the cardboard will be studied as a function on the coating composition. The last step will be to optimize the conditions of manufacturing at industrial scale, minimizing the cost of the whole process.

**Keywords:** Cardboard tray; active packaging; fresh fruits and vegetables; shelf life.

### **Resumen**

Es preciso avanzar en tecnología de envasado activo antimicrobiano, para diferenciar todavía más la calidad y vida útil de los productos hortofrutícolas frescos frente a la competencia, haciendo especial hincapié en la mejora de su calidad microbiológica y de su seguridad alimentaria. Por tanto, el objetivo principal de este trabajo será obtener a escala industrial un nuevo envase de cartón antimicrobiano, que aumentará significativamente la vida útil del producto, además de garantizar la seguridad alimentaria del mismo. Para ello, se incorporarán al envase aceites esenciales nanoencapsulados en  $\beta$ -ciclodextrinas. Además, se optimizarán las propiedades físicas de este nuevo envase, para que pueda fabricarse de forma óptima a escala industrial, respondiendo a las especificaciones mecánicas necesarias. Se estudiará cómo varían, en función de la composición, las propiedades físicas de la solución de recubrimiento del envase, y las propiedades físicas del cartón. El último paso será optimizar las condiciones y parámetros para su fabricación a escala industrial, minimizando el coste de todo el proceso.

**Palabras clave:** Bandeja de cartón; envase activo, frutas y hortalizas; vida útil.

## **1. INTRODUCCIÓN**

Se pueden aislar patógenos alimentarios en verduras frescas como tomates y pimientos simplemente lavados usados en ensaladas sin cocinar previamente el producto, ya que pueden

contaminarse en la recolección, operaciones post-cosecha, o en las etapas de almacenamiento refrigerado, y distribución [1,2]. Por ejemplo, la contaminación microbiana de tomates frescos enteros y en rodajas ha sido la causa de brotes de salmonelosis [3,4]. También, la *Salmonella enterica* var. *Typhimurium* es un agente causal de la salmonelosis no tifoidea y que puede crecer en la superficie de los tomates a temperaturas tan bajas como 12 °C [5]. Para satisfacer la demanda del mercado en cuanto a mejora de la calidad microbiológica y de aumento de la vida útil de los tomates frescos, se deben controlar las condiciones de envasado y almacenamiento refrigerado para que no favorezcan el crecimiento microbiano [6].

En la manipulación postcosecha y antes del envasado, se lleva a cabo normalmente un tratamiento de descontaminación superficial con agua clorada. Esta es la única etapa donde se puede reducir el número de patógenos y microorganismos causantes de deterioro [7]. Sin embargo, los compuestos clorados pueden reaccionar con la materia orgánica de los productos frescos y formar trihalometanos y ácidos haloacéticos, que son moléculas mutagénicas y carcinogénicas [6].

Por todo esto, se está trabajando en los últimos años en sistemas de descontaminación superficial de hortalizas sin agua clorada, y en sistemas de envasado activo antimicrobiano para reducir la microbiología alterante, disminuyendo las pérdidas económicas asociadas y aumentando la seguridad alimentaria de estos productos [8]. Así, Shemesh et al. (2016) [9] han desarrollado un tipo de plástico activo antimicrobiano que utiliza aceites esenciales nanoencapsulados en nanotubos de un aluminosilicato que aparece como eficaz en el control de *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum* y *Aspergillus niger* en distintas frutas y hortalizas, incluyendo el tomate. Estos resultados están en la línea de las propuestas de envasado activo antimicrobiano de los autores Kapetanakou y Skandamis [10], que es la línea de desarrollo de envase de cartón activo antimicrobiano que se plantea en este Proyecto de I+D, que es totalmente innovadora.

Por todo lo anterior, en este Proyecto de I+D se propone desarrollar un nuevo envase de cartón para el envasado activo de tomate fresco y pimiento dulce fresco, que se caracteriza porque el cartón posee, en su cara que comunica con el interior del envase –que entrará en contacto con el producto a granel-, un recubrimiento antimicrobiano a base de polímero que incluye también aceites esenciales formando complejos de inclusión con ciclodextrinas.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el cumplimiento de los objetivos técnicos específicos de este proyecto, se llevarán a cabo una serie de actividades con los siguientes objetivos:

- Estudiar la variación de las propiedades físicas de la solución de recubrimiento del envase, en función de su composición (componente polimérico, agente antimicrobiano,  $\beta$ -ciclodextrinas).
- Estudiar las propiedades físicas del cartón con recubrimiento activo antimicrobiano, en función de la composición del recubrimiento.
- Optimizar los parámetros de fabricación de este cartón.

**Actividad 1:** *Desarrollo de un envase de cartón activo antimicrobiano que incluya agentes antimicrobianos nanoencapsulados, para el envasado a granel de tomates frescos y pimientos frescos, para aumentar su vida útil y la calidad y seguridad alimentaria percibida por el consumidor en el momento de su consumo.*

Se estudiará la cinética de liberación de los vapores de las distintas combinaciones de aceites esenciales, en función de la temperatura y humedad relativa de conservación, para determinar la

dosis óptima mínima de aceites esenciales (AEs, mg de AEs/m<sup>2</sup> de recubrimiento de caja de cartón) con adecuada eficacia antimicrobiana.

- Se estudiará en los laboratorios de la Universidad, tanto el vapor liberado como la carga restante de aceites esenciales nanoencapsulados que quede en el recubrimiento del envase de cartón a lo largo del tiempo y en función de las condiciones de temperatura y HR de conservación. Utilizando cinco dosis de AEs, se determinarán las atmósferas generadas por estos vapores de AEs y los residuos de AEs todavía presentes en el recubrimiento de la caja de cartón. Todo esto, reproduciendo las condiciones exactas de la fabricación del cartón ondulado, y trabajando con muestras fabricadas a escala industrial. Se utilizará la metodología de Ceballos et al. [11], adaptada a este caso donde los AEs nanoencapsulados se aplican como recubrimiento del cartón en combinación con una laca polimérica en base agua.

**Actividad 2:** Validación a escala de planta piloto del prototipo de envase desarrollado de cartón activo antimicrobiano que incluya agentes antimicrobianos nanoencapsulados, para el envasado a granel de tomates frescos y pimientos frescos, para aumentar su vida útil y la calidad y seguridad alimentaria percibida por el consumidor en el momento de su consumo.

Esta segunda actividad implicará el desarrollo de una serie de tareas entre las que destaca la fabricación a escala industrial y validación de la cinética de liberación de los vapores de las combinaciones seleccionadas de aceites esenciales nanoencapsulados, en las condiciones de temperatura y humedad relativa de conservación de los productos a envasar (tomates y pimientos frescos), siguiendo la metodología indicada anteriormente.

- Se fabricará a escala industrial y validará a escala de planta piloto el comportamiento físico de muestras de cajas de cartón del prototipo de envase desarrollado de cartón activo antimicrobiano que incluya agentes antimicrobianos nanoencapsulados, para el envasado a granel de tomates frescos y pimientos dulces frescos. Se estudiarán en laboratorios de la Universidad y en el laboratorio de la empresa las propiedades físicas y barrera del cartón fabricado a escala industrial, en las combinaciones seleccionadas para su aplicación al envasado de tomates frescos y pimientos dulces frescos. Los análisis de propiedades físicas del cartón recubierto se llevarán a cabo, en parte, de acuerdo con el trabajo de Taboada-Rodríguez et al. [12], adaptados a este nuevo recubrimiento.

**Actividad 3:** Validación a escala industrial del prototipo de envase desarrollado de cartón activo antimicrobiano que incluya agentes antimicrobianos nanoencapsulados, para el envasado a granel de tomates frescos y pimientos frescos, para aumentar su vida útil y la calidad y seguridad alimentaria percibida por el consumidor en el momento de su consumo.

Fabricación y validación a escala industrial de muestras del prototipo de envase desarrollado de cartón activo que incluya agentes antimicrobianos nanoencapsulados.

- Fabricación y validación a escala industrial del comportamiento físico de muestras de cartón del prototipo de envase desarrollado de cartón activo antimicrobiano. Se estudiarán en laboratorio las propiedades físicas y barrera de muestras del cartón fabricado y utilizado a escala industrial, en las combinaciones seleccionadas para su aplicación al envasado de tomates frescos y pimientos dulces frescos. Los análisis de propiedades físicas del cartón recubierto se llevarán a cabo, en parte, de acuerdo con el trabajo de Taboada-Rodríguez et al. [12], adaptados al nuevo recubrimiento.

Se realizará un análisis estadístico mediante, el paquete estadístico R, versión 3.2.3, así como análisis de varianza (ANOVA), teniendo en cuenta un nivel de significación  $p < 0.05$ .

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez desarrolladas todas las actividades y tareas para el cumplimiento de los objetivos fijados, esperamos obtener los siguientes resultados:

- Validación de la eficacia del nuevo envase activo de cartón que consiga que estos productos frescos se perciban como productos de calidad diferenciada y vida útil extendida.
- Composición optimizada del recubrimiento para conseguir un adecuado comportamiento físico y una buena eficacia antimicrobiana.
- Parámetros óptimos de fabricación del cartón para la obtención de un coste mínimo.

#### 4. CONCLUSIONES

Los resultados que se obtengan de este Proyecto, podrán ser rápidamente publicados para dar a conocer esta nueva tecnología patentada y e introducirla rápidamente en el mercado de frutas y hortalizas, inicialmente para el envasado de tomates y pimientos frescos.

#### 5. AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis doctoral se desarrollará dentro del Proyecto titulado “Nueva caja de cartón activa antimicrobiana para alargar la vida útil de tomates y pimientos frescos envasados a granel — CARTONFRESH”, financiado por el Programa RIS3-Mur 2016 (Convocatoria RIS3Mur- Orden 12 agosto 2016 de la Consejería de Desarrollo Económico, Turismo y Empleo, Región de Murcia). Exp. nº: 2 / 16SAE00006, que lo llevará a cabo la empresa SAECO S.A. (Cartón Ondulado, Molina de Segura, Murcia) en colaboración con la Universidad Politécnica de Cartagena (Grupo de Investigación Ingeniería del Frío y la Seguridad Alimentaria, IFSA).

#### 6. REFERENCIAS

- [1] Mahmoud B.S. 2010. The effects of X-ray radiation on *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Shigella flexneri* inoculated on whole Roma tomatoes. *J. Food Microbiol.* 27: 1057–1063.
- [2] Oliveira M., Usall J., Solsona C., Alegre I., Vinas I., Abadías M. 2010. Effects of packaging type and storage temperature on the growth of foodborne pathogens on shredded ‘Romaine’ lettuce. *J. Food Microbiol.* 27: 375–380.
- [3] Moreira R.G., Puerta-Gómez A.F., Kim J., Castell-Pérez M. E. 2012. Factors affecting radiation D-values (D10) of an *Escherichia coli* cocktail and *Salmonella Typhimurium* LT2 inoculated in fresh produce. *J. Food Sci.* 77: E104–E111
- [4] Niemira B.A., Boyd G. 2013. Influence of modified atmosphere and varying time in storage on the irradiation sensitivity of *Salmonella* on sliced roma tomatoes. *J. Radiat. Phys. Chem.* 90: 120–124.
- [5] Brandwein M., Al-Quntar 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. *Front Microbiol.* 7: 159.
- [6] Choi D.S., Park S.H., Choi S.R., Kim J. S., Chun H.H. 2015. The combined effects of ultraviolet-C irradiation and modified atmosphere packaging for inactivating *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and extending the shelf life of cherry tomatoes during cold storage. *Food Packaging Shelf Life.* 3: 19-30.
- [7] Glowacz M., Rees D. 2016. Exposure to ozone reduces postharvest quality loss in red and green chilli peppers. *Food Chem.* 210: 305-310.
- [8] Van long N.N., Joly C., Dantigny P. 2016. Active packaging with antifungal activities. *Int. J. Food Microbiol.* 220: 73-90.
- [9] Shemesh R., Krepker M., Nitzan N., Vaxman A., Segal E. 2016. Active packaging containing encapsulated carvacrol for control of postharvest decay. *Postharvest Biol. Technol.* 118: 175-182.
- [10] Kapetanidou A.E., Skandamis P. N. 2016. Applications of active packaging for increasing microbial stability in foods: Natural volatile antimicrobial compounds. *Curr. Opin. Food Sci.* 12: 1-12.
- [11] Cevallos P.A.P., Buera M.P., Elizalde B.E. 2010. Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in betacyclodextrin: effect of interaction with water on complex stability. *J. Food Eng.* 99: 70-75.
- [12] Taboada-Rodríguez A., García-García I., Cava-Roda R., López-Gómez A., Marín-Iniesta F. 2013. Hydrophobic properties of cardboard coated with polylactic acid and ethylene scavengers. *J. Coat. Technol. Res.* 10(5): 749-755.



# POSTER SESSION II:

## Agroforestry and Economy Engineering



## Energy consumption and greenhouse gas emissions of two lettuce production systems

### Análisis energético y de emisiones de gases de efecto invernadero de dos sistemas de producción de lechuga

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

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

\*miguelmartinezmate@gmail.com

#### **Abstract**

Climate change is making itself felt in some regions of the Mediterranean basin as water availability is under continuous decrease. Farming sustainability depends on improving water and energy use efficiencies by using innovative agricultural technologies. This study quantifies the energy consumption and greenhouse gas (GHG) emissions associated to two lettuce production systems, conventional soil cultivation (SC) and nutrient film technique (NFT). The implementation of NFT significantly increased annual energy consumption and GHG emissions by 5.6 and 2.2 times, respectively. However, annual yield was also increased by 4.8 times in NFT production. Therefore, specific energy consumptions were similar for SC (3.61 MJ kg<sup>-1</sup>) and NFT (4.23 MJ kg<sup>-1</sup>) production, while specific GHG emissions were notably lower for NFT production (0.11 kg CO<sub>2eq</sub> kg<sup>-1</sup>) compared with SC production (0.23 kg CO<sub>2eq</sub> kg<sup>-1</sup>).

**Keywords:** Nutrient film technique; carbon footprint; water-energy productivity; fertigation.

#### **Resumen**

El cambio climático se está haciendo sentir en algunas regiones de la cuenca del Mediterráneo, ya que la disponibilidad de agua se encuentra en continua reducción. La sostenibilidad de la agricultura depende del uso de tecnologías agrícolas innovadoras que permitan la mejora de la eficiencia en el uso del agua y la energía en los cultivos. Este estudio cuantificó el consumo de energía y las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) asociados a dos sistemas productivos de lechuga, cultivo convencional en suelo (CS) y nutrient film technique (NFT). La implementación de NFT aumentó significativamente el consumo anual de energía y las emisiones de GEI en 5,6 y 2,2 veces, respectivamente. Sin embargo, el rendimiento anual también se incrementó 4,8 veces en NFT. Por lo tanto, los consumos específicos de energía fueron similares para la producción de CS (3,61 MJ kg<sup>-1</sup>) y de NFT (4,23 MJ kg<sup>-1</sup>), mientras que las emisiones específicas de GEI fueron notablemente menores en NFT (0,11 kg CO<sub>2eq</sub> kg<sup>-1</sup>) en comparación con CS (0,23 kg CO<sub>2eq</sub> kg<sup>-1</sup>).

**Palabras clave:** Huella de carbono; productividad agua-energía; fertirrigación.

## 1. INTRODUCCIÓN

El sureste (SE) de España es una de las regiones con mayor déficit hídrico en Europa (EU); déficit estructural de 400 hm<sup>3</sup> por año [1]. En esta región el consumo agrícola representa más del 80% de los recursos hídricos. A pesar de este gran déficit, se desarrolla una agricultura muy productiva e intensiva cuyas consecuencias ambientales son la sobreexplotación y contaminación por nitratos de acuíferos.

El uso de tecnologías agrícolas innovadoras como el cultivo hidropónico, y más concretamente el Nutrient Film Technique (NFT), que permite recircular el agua aplicada a las plantas y reducir las consecuencias ambientales, es una alternativa para mantener la agricultura en estas regiones.

Este estudio evaluó el consumo de energía y las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) de un cultivo de lechuga analizando dos sistemas de cultivo diferentes: cultivo convencional en suelo (CS) y NFT.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la Cuenca del Segura. Se han elegido dos unidades funcionales: 1 kg de lechuga y 1 ha de cultivo. Se han considerado los siguientes insumos: mano de obra, diésel y maquinaria, material vegetal, electricidad para riego, embalse y sistema de riego, fertilizantes y pesticidas.

A partir de los datos de valores de insumos necesarios para el cultivo de lechuga en ambos sistemas de producción se realizó la valoración energética de los mismos y posteriormente las emisiones GEI asociadas.

El consumo de energía se dividió en energía directa e indirecta. El uso directo de energía correspondió a la labor humana, la electricidad y el diésel. El uso indirecto abarcó el material consumido en fabricar fertilizantes, los plaguicidas, material vegetal, sistema de riego y sistema hidropónico. Las equivalencias utilizadas para transformar los inputs y outputs del cultivo en unidades energéticas se obtuvieron de Martín-Górriz et al. [2].

La evaluación de las emisiones de GEI se estructuró en tres grandes grupos: (i) emisiones debidas al uso de combustibles fósiles y electricidad; (ii) emisiones debidas a la producción, el transporte, el almacenamiento y la aplicación de químicos agrícolas; y (iii) emisiones de NO<sub>2</sub> por fertilizantes nitrogenados, siguiendo la metodología propuesta por Lal [3]. Las emisiones de GEI se determinaron multiplicando la tasa de aplicación de insumos empleados por su correspondiente factor de emisión [2].

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La energía anual total necesaria en el cultivo NFT fue 5,6 veces mayor que en el cultivo CS (1.039.319 MJ ha-año<sup>-1</sup> frente a 184.900 MJ ha-año<sup>-1</sup>). En el cultivo CS la mayor parte del consumo de energía se atribuyó a material vegetal (33,5%), resultado similar al observado por Bojaca et al. [4] en cultivos en Bogotá. La electricidad para el riego, el diésel y el equipamiento del sistema de riego representaron un 24,7%, 13,4% y 10,2%, respectivamente (Figura 1).

En NFT, el consumo de energía se debió principalmente a la electricidad del riego (41,1%), seguido del material vegetal (28,6%), el sistema hidropónico (13,8%) y los fertilizantes (13,3%) (Figura 1). La electricidad para el riego se asoció fundamentalmente al funcionamiento continuo de las bombas de riego. Una alternativa para reducir significativamente el consumo de energía es por lo tanto la utilización de tecnologías alternativas como el uso de placas solares fotovoltaicas [5].

En el sistema NFT, la productividad del agua fue 2,63 veces mayor (NFT; 36,37 kg m<sup>-3</sup>) que en el cultivo CS (13,82 kg m<sup>-3</sup>).

La energía específica en NFT y CS fue 4,23 MJ kg<sup>-1</sup> y 3,61 MJ kg<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 2). La eficiencia en el uso de la energía fue similar en ambos sistemas; 0,14 y 0,17, respectivamente (Figura 3).

Las emisiones totales anuales de GEI producidas en el sistema NFT (25,724 kg de CO<sub>2eq</sub> ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>) doblaron las observadas en CS (11,760 kg de CO<sub>2eq</sub> ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>). Sin embargo, las emisiones específicas de GEI fueron menores en el caso del cultivo NFT (0,11 kg CO<sub>2eq</sub> kg<sup>-1</sup>) que en cultivo CS (0,23 kg CO<sub>2eq</sub> kg<sup>-1</sup>) (Figura 4).

En CS las mayores emisiones se debieron al sistema de riego por goteo (40,1%), seguido del nitrógeno para fertilización (16%), el equipamiento de riego (15,8%) y el diésel (15,6%) (Figura 4). Del mismo modo, en NFT las mayores emisiones se asociaron por el sistema de riego hidropónico (40,3%), seguido de la electricidad para el riego (29%) (Figura 4). Esto se debió a la gran infraestructura que requiere un sistema NFT y el funcionamiento continuo de las bombas.

#### 4. CONCLUSIONES

Las conclusiones extraídas del presente estudio son:

- La tecnología agrícola mejora la productividad del agua.
- El sistema NFT requiere un consumo específico de energía similar que CS para el cultivo de lechuga.
- El sistema NFT produce menos emisiones específicas de GEI que CS.
- La implementación de sistemas NFT en lugar de CS permite una agricultura sostenible desde el punto de vista energético y medioambiental.

#### 5. REFERENCIAS

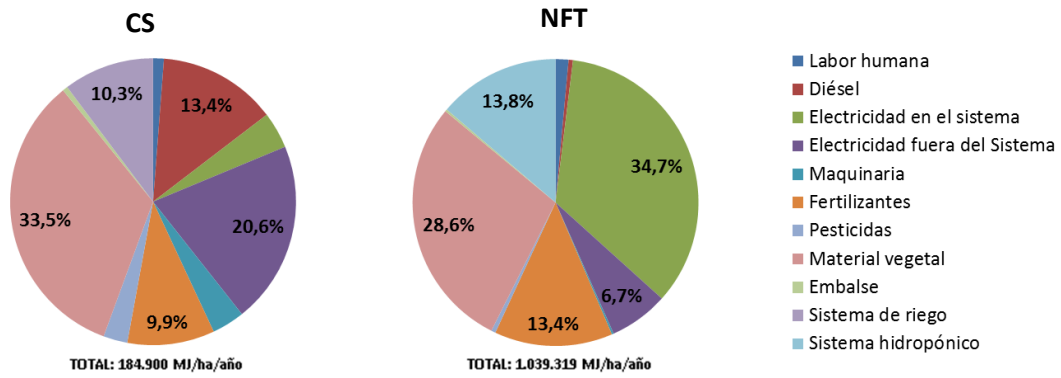
[1] CHS. 2015. Confederación Hidrográfica de la Cuenca del Segura. 2015. Plan Hidrológico de la Demarcación del Segura 2015-2021. Murcia, Spain. Pp 762.

[2] Martín-Górriz B., Soto-García M., Martínez-Alvárez V. 2014. Energy and greenhouse-gas emissions in irrigated agriculture of SE (southeast) Spain. Effects of alternative water supply scenarios. *Energy* 77: 478–488.

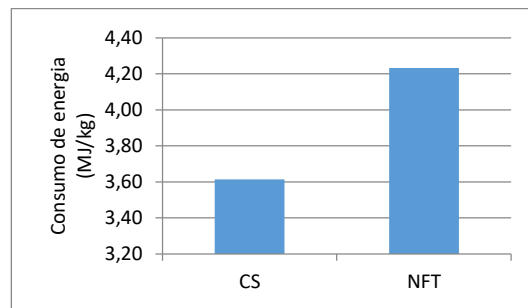
[3] Lal R. Carbon emission from farm operations. 2004. *Environ. Int.* 30: 981–990.

[4] Bojaca C.R., Schrevels E. 2010. Energy assessment of peri-urban horticulture and its uncertainty: case study for Bogota, Colombia. *Energy*: 35(5):2109–2118.

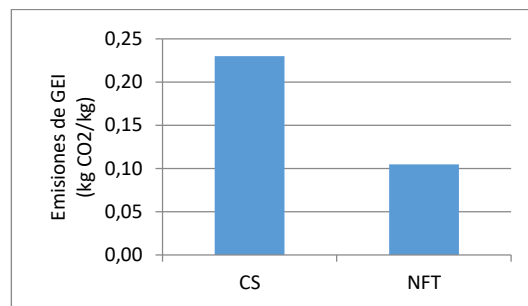
[5] Rothwell A., Ridoutt B., Page G., Bellotti W. 2016. Environmental performance of local food: trade-offs and implications for climate resilience in a developed city. *J. Clean Prod.* 114: 420–430.



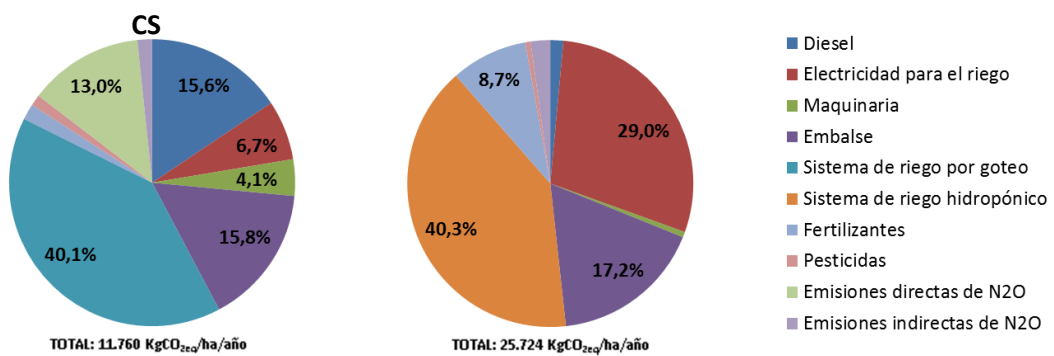
**Figura 1.** Consumo de energía específico por categorías en el sistema CS y NFT.



**Figura 2.** Consumo anual de energía en sistema CS y NFT.



**Figura 3.** Emisiones específicas de GEI en sistema CS y NFT.



**Figura 4.** Emisiones de GEI por categorías en el sistema NFT.

## Improvements in the control of table olive pitting, slicing and stuffing machines

## Mejoras en el control de máquinas deshuesadoras rodajadoras y de relleno de aceituna de mesa

A. Lucas-Pascual<sup>1\*</sup>, A. Madueño-Luna<sup>2</sup>, A. Ruiz-Canales<sup>3</sup>, J. M. Molina-Martínez<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Doctorando Universidad Politécnica de Cartagena, Domicilio: Redes, 40, 41002, Sevilla, Spain.

<sup>2</sup>Aerospace Engineering and Fluid Mechanical Department, University of Sevilla, 41013 Sevilla, Spain.

<sup>3</sup>Engineering Department, University Miguel Hernández of Elche, 03312 Orihuela, Spain.

<sup>4</sup>Food Engineering and Agricultural Equipment Department, Technical University of Cartagena, 30203 Cartagena, Spain.

\*info@albertolucas.es

### **Abstract**

**The proposed research attempts to analyze the current limitations of table olive pitting, slicing and stuffing machines and create a system for the detection of malfunctions, the quantification and optimization of performance, and lastly, for their monitoring and remote control, adaptable to any machine model. To achieve it, the research will consist in the use of modern hardware and software analysis techniques using computer programs, microcontrollers and single board computers (SBC) as well as introducing electronics through non-contact sensors in the machine.**

**Keywords:** Arduino; Raspberry Pi; Magnetic and Optical Contactless Sensors; Server-Client Platform.

### **Resumen**

**El trabajo de investigación propuesto trata de analizar las limitaciones actuales de las máquinas deshuesadoras, rodajadoras y de relleno (DRR) de aceituna de mesa, crear un sistema para la detección de fallos de funcionamiento en las mismas, la cuantificación y optimización del rendimiento, y, por último, su monitorización y control remoto, adaptable a cualquier modelo. Para ello se valdrá del uso de modernas técnicas de análisis tanto por hardware como por software empleando programas informáticos, microcontroladores y ordenadores monoplaca (SBC) así como introduciendo electrónica de control mediante sensores sin contacto en la máquina.**

**Palabras clave:** Arduino; Raspberry Pi; Sensores ópticos y magnéticos sin contacto; Plataforma cliente-servidor.

## **1. INTRODUCCIÓN**

Las máquinas deshuesadoras/rodajadoras de aceituna y de relleno (DRR), son máquinas rotativas que constituyen un estándar en el sector de la aceituna de mesa. De forma sucinta, constan de: una tolva alimentadora donde se depositan las aceitunas a deshuesar, una cadena de alimentación de cangilones donde las aceitunas son transportadas hasta un tambor giratorio, y

allí, unos punzones extraen los huesos ayudados de unas varillas desplazadoras. Finalmente las aceitunas deshuesadas son conducidas a una salida de la máquina y los huesos a otra.

En su forma habitual estas máquinas poseen:

1. Un control manual de la velocidad de funcionamiento a través de un variador electrónico de frecuencia, lo que permite modificar el rendimiento de la máquina entre ciertos límites definidos por la seguridad e integridad de la propia máquina a altas velocidades, calidad de la aceituna a procesar, restricciones de la cadena de producción de la fábrica, etc.
2. Un sistema rudimentario de detección de fallos de funcionamiento consistente en un sensor en la tolva de alimentación para detectar si esta se ha quedado sin aceitunas y un sensor de apertura de la carcasa de protección que evita que funcione la máquina si esta carcasa no está cerrada.

Este trabajo busca mejorar el sistema de control de este tipo de máquinas DRR con la adición de:

1. Un sistema de sensores y hardware electrónico que permiten, a partir de un sensor de sincronismo, controlar la rotura de punzones, la rotura de las barras desplazadoras de los huesos de aceitunas, la presencia de varias aceitunas en un mismo cangilón de la cadena de alimentación y la falta de limpieza en la cadena de alimentación.
2. Un sistema de cuantificación del número real de aceitunas que van en la cadena de alimentación.
3. Un control de la velocidad de funcionamiento de la máquina basado en un algoritmo de optimización del rendimiento productivo.
4. Un sistema de monitorizado remoto de la máquina y de control de la misma.
5. Un sistema de señalización óptico/acústico que indica en primera instancia al operario encargado del mantenimiento de la máquina la posible anomalía que se ha detectado.
6. Un sistema de alineamiento y ajuste de los sensores que facilita, tanto durante su montaje en fábrica como en revisiones/reparaciones posteriores de la máquina, un perfecto funcionamiento de los mismos.

## **2. ESTADO DEL ARTE DEL PROBLEMA**

El trabajo pretende llevar a la práctica la patente de invención P201300242 “Sistema y 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”, donde se describe un procedimiento y sistema que permitiría conseguir los objetivos propuestos.

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

Se van a emplear sensores magnéticos y ópticos sin contacto conectados a un micro-controlador tipo Arduino para crear un sistema síncrono que trabaja a la misma velocidad que la máquina y que será el encargado de generar la información del funcionamiento de la máquina DRR.

Se empleará un sensor magnético colocado en un lateral de la zona superior de la cadena o pista de alimentación de aceitunas para detectar la presencia o no del metal correspondiente a cada cangilón que transporta de forma individual cada aceituna hacia la zona donde será

punzonada para extraerle el hueso. Este será el procedimiento para sincronizar el sistema de monitorización con la máquina con el objeto de abrir una ventana temporal de análisis.

En cuanto al sensor óptico, se empleará uno de tipo herradura y haz infrarrojo/láser colocado lo más cerca posible de donde este el sensor magnético para generar los diferentes estados de la máquina de estado que permite detectar la presencia o no de aceitunas en el cangilón. Este sensor detectará tanto metal como aceitunas sobre la cadena.

Adicionalmente, se emplearán otros dos sensores magnéticos en la zona del tambor giratorio para el control del estado de punzones y varillas desplazadoras y saber si están rotas o dobladas.

La información que se extrae del funcionamiento de la máquina se enviará por puerto serie a un ordenador monoplaca (SBC) del tipo Raspberry Pi que será la encargada de registrar los datos que el Arduino genere. Luego, la placa Raspberry, mediante un sistema cliente – servidor, enviará por conexión Ethernet la información a un equipo que hará las veces de servidor, en este caso, se empleará otra SBC Raspberry Pi, que conformará el sistema de monitorización y control remoto.

El servidor usará una plataforma en forma de portal web para mostrar el estado, velocidad y rendimiento en tiempo real de todas las máquinas que tenga conectadas de forma que el operario de planta pueda de una forma sencilla, conocer el estado de la máquina DRR con una simple visualización en un PC/Tablet/Móvil.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estado preliminar se presenta el caso en estudio. En la figura 1 se muestra un ejemplo teórico de las señales de salida de los sensores (S1: magnético, S2: óptico).

Dicha figura muestra las salidas de S1 (14) y S2 (15) y los intervalos temporales (16), (17), (19), (21) y (23), donde se efectúa el análisis de la información proporcionada por ambos sensores. El comienzo de cada ventana de análisis se corresponde con la llegada de un nuevo cangilón en la proximidad de S1. El flanco ascendente y nivel alto de este pulso es producido por el saliente de la cadena de alimentación que pasa por la proximidad del sensor y el flanco descendente y nivel bajo se produce cuando no hay saliente en la proximidad del sensor. El esquema expuesto en esta figura se corresponde con varias situaciones:

(16): En este intervalo, el haz luminoso del sensor S2 no es interceptado por ninguna aceituna, es el caso de un cangilón vacío.

(17): El haz luminoso es interceptado por la presencia de una aceituna en el cangilón.

(19): El haz luminoso del sensor S2 es interceptado dos veces (dos aceitunas que no están en contacto entre si y van en el mismo cangilón).

(21): El haz luminoso del sensor S2 es interceptado una vez (dos aceitunas que están en contacto entre si y van en el mismo cangilón).

(23): El cangilón presenta suciedad en toda su extensión o el orificio por donde pasa el haz luminoso del sensor S2 se ha taponado.

La duración y forma de las interceptaciones del haz luminoso del sensor S2 (18), (20), (22) y (24), permiten identificar la situación concreta del cangilón que se está analizando. Estas duraciones obviamente, son función del calibre de la aceituna y/o de la velocidad de trabajo de la máquina, siendo ambos datos necesarios para los cálculos que se efectúan en el microcontrolador.

## 5. CONCLUSIONES

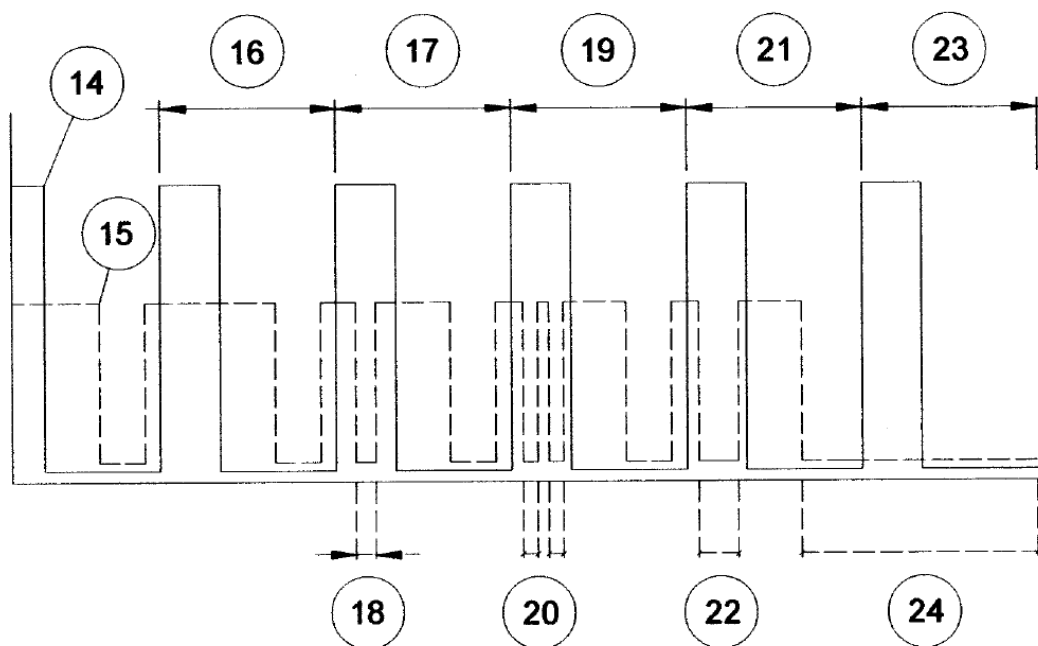
Este trabajo se ha presentado un caso de estudio para la mejora de las máquinas DRR. Se ha expuesto como se va a desarrollar el sistema que mejora las máquinas DRR: uso de dos tipos de sensores, microcontrolador y ordenadores monoplaca y entorno de control html. Se ha presentado la salida de los sensores que permitirá el desarrollo de la máquina de estado que va en el microcontrolador.

## 6. AGRADECIMIENTOS

Se agradece a los autores de la patente P201300242, el uso de la misma para este trabajo de investigación.

## 7. REFERENCIAS

[1] Madueño et al. 2013. Patente P201300242: Sistema y 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. <http://invenes.oepm.es/InvenesWeb/detalle?referencia=P201300242>



**Figura 1.** Muestra de las señales de salida esperadas de los sensores magnético (14) y óptico (15)



## Analysis of the performance of the feeding chain in olive pitting machines by artificial vision and neural networks

## Análisis del funcionamiento de la cadena de alimentación de las máquinas deshuesadoras de aceitunas mediante diagnosis por visión artificial y redes neuronales

M. de Iódar<sup>1\*</sup>, A. Madueño-Luna<sup>2</sup>, A. Ruiz-Canales<sup>3</sup>, J. M. Molina-Martínez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Food Engineering and Agricultural Equipment Department, Technical University of Cartagena, 30203 Cartagena, Spain.

<sup>2</sup>Aerospace Engineering and Fluid Mechanical Department, University of Sevilla, 41013 Sevilla, Spain.

<sup>3</sup>Engineering Department, University Miguel Hernández of Elche, 03312 Orihuela, Spain.

\*manueldejodar@gmail.com

### Abstract

Olive pitting machines are characterized by the fact that their optimum working is linked to a good adjustment: selection of the right feeding disc for the variety of olive and its calibre, the geometric features of supply chain, etc. The first of these elements pins up the optimum input of olives in the feeding chain, keeping off buckets with gap or more than one olive there. The second element pins up the right position of the olives to be pitted, keeping off this olive be pitted for no main axe. The present paper analyses the right position of the olives in the buckets of the feeding chain, using: 1) An artificial vision system with external triggering be able to take photos for each bucket in front of the camera; 2) A neuronal network classified, in a right teaching way, it can classify the bucket in four possible cases: empty, normal, and incorrect olive position. The analysis has been carried out using tool-box of Matlab neuronal network. Last, the paper analyses the use of physics chips (Intel Curie and NeuroMem CM1K) with neuronal network for classification.

**Keywords:** Artificial Neural Networks; Pitting Machines; Table Olives, Arduino; BrainCard.

### Resumen

Las máquinas deshuesadoras de aceitunas se caracterizan porque su funcionamiento óptimo está vinculado a un buen ajuste: selección de un plato de alimentación adecuado a la variedad de aceituna y su calibre, de las características geométricas de la cadena de alimentación, etc. El primero de estos elementos fija la entrada óptima de aceitunas en la cadena de alimentación, impidiendo que queden cangilones vacíos o se llenen con más de una aceituna. El segundo elemento fija la correcta posición de la aceituna para ser deshuesada. El trabajo propuesto analiza la correcta ubicación de las aceitunas en los cangilones de la cadena de alimentación, para lo que se utiliza: 1) Un sistema de visión artificial con disparo externo capaz de extraer una foto de cada cangilón que pase frente a una cámara; 2) Una red neuronal clasificadora que, adecuadamente entrenada, permita clasificar el cangilón en cuatro posibles estados: vacío, normal, y casos anómalos (con dos aceitunas, o con aceituna mal posicionada). Finalmente, se valorará el uso de chips físicos neuromórficos (Intel Curie y NeuroMem CM1K) para la clasificación.

**Palabras clave:** Redes Neuronales Artificiales; Máquinas Deshuesadoras; Aceitunas de Mesa; Arduino; BrainCard.

## 1. INTRODUCCIÓN

Hasta el año 1970, el deshuesado y relleno de las aceitunas de mesa se hacía manualmente según indica Santos Siles [1]. La aparición entonces de las primeras máquinas deshuesadoras, con una producción de 220 frutos por minuto, supuso en su día un importante avance, implantándose rápidamente en España y en otros países por la reducción de costes que supuso.

La primera máquina deshuesadora-rellenadora fue desarrollada por la empresa sevillana SADRYM en colaboración con el Instituto de la Grasa, patente registrada [2], implantándose rápidamente en el sector, ya que resolvía la mecanización del relleno de aceitunas con pimiento. Este hecho permitió un gran desarrollo de la exportación de este tipo de producto, que tiene muy buena aceptación en Estados Unidos, Canadá y otros países de Europa, donde la demanda era superior a la propia capacidad productiva.

En 1975 aparecen las primeras máquinas deshuesadoras del tipo continuo [3], cuyos modelos mejorados en la actualidad permiten producciones de hasta 2.500 aceitunas/minuto, equivalente a 350 Kg/h de fruto.

En la actualidad existen en el mercado máquinas deshuesadoras/rodajadoras/rellenadoras para todo tipo de calibres, es decir, desde el tamaño 400 al 80 (el tamaño se calcula como la cantidad de aceitunas que entran en 1 kilogramo). Además, se han registrado invenciones que consiguen mejoras sustanciales en varios puntos del proceso, como es la posibilidad de la optimización del rendimiento y la detección de fallos en remoto [4].

El objetivo de este trabajo es dar solución a los problemas más frecuentes que se presentan en las líneas de deshuesado de la aceituna de mesa mediante el uso de un sistema innovador basado en redes neuronales con chip físico y visión artificial. En concreto, se pretende resolver los siguientes problemas:

- Los llamados “Barcos”, son aceitunas que se posicionan incorrectamente en el momento del deshuesado, siendo deshuesadas por su eje menor, lo que provoca rotura del hueso, con el riesgo de que queden esquirlas de hueso en el interior de la propia aceituna, presencia de todo el hueso dentro de la aceituna, o aceitunas rotas. También puede provocar el desplazamiento o la rotura de camas.
- Vacíos, cuando el cangilón no se ha llenado con la aceituna y no existe, por tanto, producto que deshuesar.
- Dobles y otros casos anómalos (p.e. aceitunas partidas o fragmentos de las mismas), ocurre cuando dos aceitunas comparten en el mismo cangilón, esto provoca que no puedan ser deshuesadas correctamente, como resultado se obtienen o aceitunas rotas o aceitunas sin deshuesar. Igualmente, a veces, las aceitunas ya vienen rotas al entrar en la cadena de alimentación.

## 2. ESTADO DEL ARTE

A continuación, se muestran casos destacables del uso de redes neuronales implementadas por hardware.

- 1) Sistema de inspección del pescado mediante un Chip paralelo y red neuronal: En el año 2008 los investigadores Anne Menendez, Guy Paillet publican un artículo en la Asociación para el avance de la inteligencia artificial (AAAI) ubicada en Palo Alto, California, EEUU, sobre un sistema de aprendizaje, CogniSight, se utiliza para la inspección de los peces antes del fileteado en alta mar [5].

- 2) Sistema de inspección de botellas con Chip Neuromem CM1K: Los investigadores Anne Menendez y Guy Paillet desarrollan en 2013 un dispositivo que mediante el uso de una cámara inteligente reconoce botellas aptas o no aptas a medida que pasan sobre la zona de control, a una velocidad de 30 unidades por segundo, de manera que se desvían las que están vacías, con bajo nivel o sin tapas [6].
- 3) Sistema de detección de defectos en superficie: La empresa General Vision, con sede en California, EEUU, realiza en 2013 el proyecto denominado Defect Detection System (DDS), consistente en una cadena de sensores de visión en miniatura (MTVS, también conocida como "sensor") montado en un carril DIN y espaciados de manera que sus campos de visión cubren toda la anchura del material a inspeccionar, cada sensor cuenta con un motor de reconocimiento de textura de alta velocidad basado en un chip de red neuronal [7].
- 4) Reconocimiento de matrículas de vehículos basado en una red neuronal: En 2011 los investigadores YiQing Liu, Dong Wei, Ning Zhang y MinZhe Zhao del Instituto Arquitectura e Ingeniería Civil de Beijing implementan un sistema de reconocimiento de matrículas basado en redes neuronales. El sistema utiliza un chip de red neuronal para reconocer placas de matrícula [8].
- 5) Seguimiento de destino: Wendall C. Deck del Real Colegio Militar de Canadá publica en 2010 un artículo sobre el uso de procesadores ZISC (computador sin conjunto de instrucciones/ Zero Set Computer). Este tipo de procesador desarrollado en los años 90 por Guy Paillet, emplea redes neuronales artificiales y procesamiento paralelo masivo [9].
- 6) Desarrollo de un sensor miniaturizado de frente de onda basado en una red neuronal: En 2010 el Instituto San Louis en Francia desarrolla a través de Marc Eichhorn y Alexander Pichler, un sensor de frente onda basado en una red neuronal. Permite la realización de óptica adaptativa: generación de frentes de onda planos, generación de frentes de onda específicos para metrología o la evaluación de enfermedades oculares [10].

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

La elección de la visión artificial debe considerar la opción de activación de disparo de manera externa (trigger externo), ya que la toma de imágenes debe estar coordinada con el paso del cangilón y el disparo de la iluminación. Otro punto importante a tener en cuenta en la elección de la cámara es la posibilidad de poder realizar en la propia cámara la selección del área de interés (ROI: región of interest). En una primera instancia, la aplicación actual de la gestión del ROI y el escalado se va llevar a cabo por software desde Matlab y en diferido. Con posterioridad se analizará la adquisición de imágenes en tiempo real empelando C++ y las librerías de OpenCV.

La cámara se debe poder conectar por USB y controlarse directamente por Matlab. Cada imagen capturada se obtiene mediante el disparo externo de la misma a partir de la señal de un sensor magnético que detecta el paso de los cangilones en la cadena de alimentación. Para la correcta iluminación se usará una lámpara de diodos led de potencia que se sincroniza con el disparo externo procedente del sensor magnético.

Para generar la señal de disparo externo a partir de la señal procedente del sensor magnético, se implementará un circuito electrónico que controle el momento en el que se debe encender y apagar la lámpara led y sincronizar con el disparo de la cámara. Asimismo, se va utilizar la aplicación Neural Network de Matlab para entrenar una red neuronal profunda para la clasificación de imágenes captadas mediante visión artificial.

Por último, se realizará el entrenamiento y testeo de la red neuronal artificial con chip físico, el cual será capaz de poder distinguir los fallos anteriormente indicados en tiempo real y realizar la clasificación de las aceitunas dispuestas en la cadena.

#### 4. AGRADECIMIENTOS

Se agradece a los autores de la patente P201300242 el uso de la misma para este trabajo de investigación. Se agradece a la empresa TeleNatura EBT S.L. por la integración de nuevas tecnologías en la agricultura y por tanto servir de referencia para el desarrollo de proyectos tecnológicos.

#### 5. REFERENCIAS

- [1] Santos Siles F.J. 1999 Las nuevas tecnologías aplicadas al sector de la aceituna manzanilla fina. Grasas y Aceites. 50-2: 131-140.
- [2] del Ser González C. 1987. Método para deshuesar y deshuesar-rellenar aceitunas dispositivo para su puesta en práctica y producto obtenido con el mismo. Patente de invención. Número de publicación: ES2000150 A6.
- [3] Fernández Cano S. 2012. Mejora de las líneas de deshuesado de una envasadora de aceitunas. Proyecto Fin de Carrera. (Escuela Técnica Superior de Ingeniería, ICAI, Madrid, Spain).
- [4] 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, P201300242.
- [5] Menendez A., Paillehttp G. 2016. Fish Inspection System Using a Parallel Neural Network Chip and the Image Knowledge Builder Application. <http://www.aaai.org/ojs/index.php/aimagazine/article/view/2084>.
- [6] Menendez A., Paillehttp G. 2013. Bottle inspection with neuromem. [http://general-vision.com/publications/AN\\_BottleInspectionWithCogniSight.pdf](http://general-vision.com/publications/AN_BottleInspectionWithCogniSight.pdf).
- [7] Menendez A., Paillehttp G. 2016. Surface Defect Detection System. [http://www.general-vision.com/datasheet/DS\\_DDS.pdf](http://www.general-vision.com/datasheet/DS_DDS.pdf).
- [8] YiQing L., Dong W. 2011. Vehicle-license-plate recognition based on neural networks. Paper presented at: 2011 IEEE International Conference on Information and Automation (Shenzhen, China).
- [9] Deck W.C. 2010. Target Tracking with the Zero Instruction Set Computer. (VDM Verlag Dr. Müller, Saarbrücken, Alemania).
- [10] Eichhorn M., Pichler A. 2010. Development of a miniaturised wavefront sensor based on a neural network. [http://general-vision.com/pub3rdparty/3P\\_AdaptiveOptics\\_Elsi.pdf](http://general-vision.com/pub3rdparty/3P_AdaptiveOptics_Elsi.pdf).

## Design of the first prototype of an equipment for irrigation management using weighing lysimetry (LP1)

## Diseño del primer prototipo de un equipo para la gestión del riego mediante lisimetría de pesada (LP1)

J.A. Nicolás-Cuevas<sup>\*1</sup>, D. Parras-Burgos<sup>2</sup>, Leandro Ruiz-Peñalver<sup>1</sup>, J.M. Molina-Martínez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Investigación de Ingeniería Agromónica y del Mar. Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena, Murcia, España.

<sup>2</sup>Departamento de Expresión Gráfica. Universidad Politécnica de Cartagena, C/ Doctor Fleming, s/n, 30202 Cartagena, Murcia, España.

\*juan.nicolas@upct.es

### **Abstract**

The weighing lysimetry is an accurate and reliable technology that quantifies crop evapotranspiration. The most widely used lysimeters on the market are large and require a civil engineering work for their installation that involves a certain complexity and a considerable economic investment in its placement. This communication presents the design of the first prototype of an equipment for irrigation management using weighing lysimetry focused on its employment on farms earmarked for horticultural crops. The design considers, among other factors, the ease of installation, transportability, minimum alteration of the soil and precision of the measurements.

**Keywords:** water resources; precision agriculture; evapotranspiration; construction.

### **Resumen**

La lisimetría de pesada es una tecnología precisa y fiable que mide los valores de la evapotranspiración de los cultivos. Los lisímetros de pesada más extendidos en el mercado son de grandes dimensiones y requieren de una obra civil para su instalación que implica una cierta complejidad y una considerable inversión económica en su instalación. En esta comunicación se presenta el diseño del primer prototipo de un sistema para la gestión del riego mediante lisimetría de pesada enfocado a su empleo en explotaciones agrícolas dedicadas a cultivos hortícolas. En el diseño se contempla, entre otros factores, la facilidad de montaje, transportabilidad, mínima alteración del suelo y precisión de las mediciones.

**Palabras clave:** recursos hídricos; agricultura de precisión; evapotranspiración; construcción.

## 1. INTRODUCCIÓN

La determinación de la evapotranspiración de los cultivos (ET<sub>c</sub>) es un dato fundamental para un uso eficaz del agua, adecuando la cantidad y la frecuencia del riego a las demandas de cada cultivo [7]. Existen diversos métodos tanto para medir como para estimar la ET<sub>c</sub>, siendo el lisímetro de pesada el procedimiento que proporciona los valores más precisos de ET<sub>c</sub> [1, 3, 5, 7]. En los lisímetros de pesada el incremento o pérdida de agua se mide por el cambio en la masa obtenido pesando el recipiente en el que se encuentra el suelo. Actualmente existen numerosos métodos y herramientas en el ámbito agronómico para determinar el peso de los cultivos que comprenden una gran variedad de modelos, funcionamiento y precios [6, 9, 10].

Habitualmente los lisímetros son difíciles de manejar, costosos de construir y su utilización y mantenimiento requieren de un especial cuidado, por lo que su uso suele estar restringido a centros de investigación [2]. Actualmente el desarrollo de la tecnología permite realizar lisímetros de pesada de alta precisión en la determinación de la evapotranspiración con una exactitud de centésimas de milímetro, reduciendo los costes de inversión y mantenimiento y posibilitando su uso comercial [4, 8].

El presente trabajo tiene como finalidad mostrar el diseño de un lisímetro de pesada para su uso en explotaciones agrícolas dedicadas a cultivos hortícolas. Sus principales objetivos son la facilidad de instalación, transportabilidad y una alta precisión que permita cuantificar la evapotranspiración por el cambio de peso durante intervalos pequeños de tiempo.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

El equipo diseñado para la gestión del riego mediante lisimetría de pesada se ubica en una explotación agrícola dedicada a cultivos hortícolas y comprende varios componentes que se ensamblan para formar el conjunto final. El recipiente de cultivo alberga un volumen de suelo reconstituido procedente de la parcela para reproducir las condiciones naturales y determinar la evapotranspiración del cultivo durante su crecimiento. Como el recipiente lisimétrico está independizado de su entorno, los flujos laterales y de ascenso capilar son nulos, de modo que los términos de la expresión de balance hídrico pueden ser determinados con precisión. Para drenar y medir el agua que se filtra a través del volumen de suelo confinado se utiliza un depósito de drenaje. Para conocer las variaciones en el contenido de agua en la masa de suelo y el depósito de drenaje se utiliza un sistema de pesaje. La precipitación y el riego se miden mediante pluviómetros y contadores volumétricos. De esta forma el lisímetro proporciona una medida directa de la evapotranspiración en el período de tiempo considerado.

## **3. RESULTADOS**

El lisímetro de pesada diseñado consiste en una estructura de acero inoxidable formada por chapas y barras que lo envuelven a modo de contenedor exterior. Esta estructura de contención del terreno descansa sobre una base rígida que transmite las cargas al terreno. En el interior de la estructura de contención del terreno, el recipiente de cultivo apoya sobre una estructura interior donde se encuentran las 5 células de carga: 4 para el recipiente de cultivo y 1 para el recipiente de recogida del agua drenada por el recipiente de cultivo. La señal de las células de carga es leída y almacenada en un sistema de adquisición de datos. El agua de drenaje es recolectada mediante un sistema de recipientes por gravedad y pesada, controlados ambos por electroválvulas. Las electroválvulas están alimentadas mediante corriente eléctrica de 24 voltios y todo el sistema está conectado a un cuadro de maniobra que se enlaza a la red eléctrica. Desde el cuadro de maniobra, la información de las células de carga es enviada mediante una señal inalámbrica a un servidor de alojamiento de datos en Internet.

## **4. CONCLUSIONES**

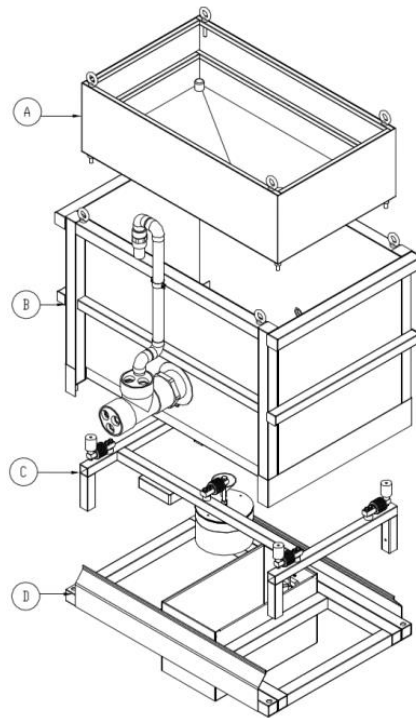
El desarrollo tecnológico actual permite realizar equipos para la gestión del riego mediante lisimetría de pesada de una elevada precisión en la determinación de la evapotranspiración de los cultivos, y de unas reducidas dimensiones que facilitan la instalación, transportabilidad y la mínima alteración del terreno.

## 5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) para la realización de proyectos de investigación, referencia: AGL2015-66938-C2-1-R. También agradecen la colaboración de la empresa TeleNatura EBT S.L.

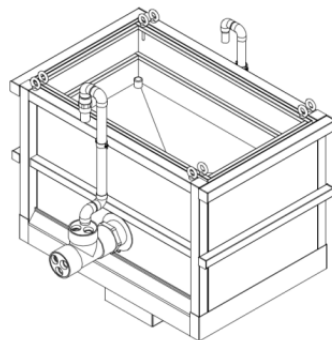
## 6. REFERENCIAS

- [1] Aboukhaled, A, J F Alfaro, and M Smith. 1982. Lysimeters. Bulletin FAO D'irrigation et de Drainage. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- [2] Allen, R. G. 2006. Evapotranspiración Del Cultivo: Guías Para La Determinación de Los Requerimientos de Agua de Los Cultivos. Estudio FAO Riego Y Drenaje. FAO.
- [3] Farahani, H J, T A Howell, W J Shuttleworth, and W C Bausch. 2007. "Evapotranspiration: Progress in Measurement and Modeling in Agriculture." St. Joseph, Mich.: ASABE.
- [4] Hertel, Christian, and Georg von Unold. 2014. "Third-Generation Lysimeters: Scientific Engineered Monitoring Systems." In Novel Measurement and Assessment Tools for Monitoring and Management of Land and Water Resources in Agricultural Landscapes of Central Asia, edited by Lothar Mueller, Abdulla Saporov, and Gunnar Lischeid, 175–84. Cham: Springer International
- [5] Howell, T. A., A. D Schneider, and M. E. Jensen. 1991. "History of Lysimeter Design and Use for Evapotranspiration Measurements." In American Society of Civil Engineers, 1–9.
- [6] Liu S. Bai J., Jia, Z., Jia, L., Zhou H., Lu L. (2009). Estimation of evapotranspiration in the Mu Us Sandland of China. Hydrol. Earth Syst. Sci., 14, 573–584.
- [7] López-Urrea, R, F Martín de Santa Olalla, C Fabeiro, and A Moratalla. 2006. "Testing Evapotranspiration Equations Using Lysimeter Observations in a Semiarid Climate." Agricultural Water Management 85 (1–2): 15–26.
- [8] Meissner, Ralph, Holger Rupp, and Manfred Seyfarth. 2014. "Advanced Technologies in Lysimetry." In Novel Measurement and Assessment Tools for Monitoring and Management of Land and Water Resources in Agricultural Landscapes of Central Asia, edited by Lothar Mueller, Abdulla Saporov, and Gunnar Lischeid, 159–73. Cham: Springer International
- [9] Xinmin Z., Lin, H.; Xiuju B., Bingxiang Z., Fahe, C., Xinzhang, S. (2007). The most economical irrigation amount and evapotranspiration of the turfgrasses in Beijing City, China. Ag. Wat. Manag. 89: 98 – 104.
- [10] Zhi-Shan Z., Li-Chao L., Xin-Rong L., Jing-Guang Z., Ming-Zhu H., Hui-Juan T. (2008). Evaporation properties of a revegetated area of the Tengger Desert, North China. Journal of Arid Environments 72: 964–973.



A) Recipiente de cultivo; B) Cajón exterior; C) Soporte del cajón de cultivo; D) Base

**Figura 1.** Vista tridimensional de los componentes del lisímetro de pesada.



**Figura 2.** Vista tridimensional del lisímetro de pesada.





# POSTER SESSION III:

## Plant Production Technology and Engineering

## Use of suppressive compost and their biological extracts to produce quality and sustainable baby leaf lettuce in soil and in tray system

## Uso de compost supresivos y sus extractos biológicos en la producción y calidad de lechuga baby leaf en suelo y bandeja

A. Giménez<sup>1\*</sup>, J.A. Fernández, C. Egea-Gilabert, J.A. Pascual

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

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

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

\*e-mail: [almudena.gimenez@upct.es](mailto:almudena.gimenez@upct.es).

### **Abstract**

The production in Spain of vegetables such as “baby leaf” lettuce is carried out mainly in natural soils. In the last years, the use of trays to cultivate this type of lettuce starts to be considered as an alternative; however, this requires to choose the right substrate to guarantee the production. The trays production systems commonly use peat as organic substrate. Its use implies the presence of pathologies that affect the development process and the final quality. Among them, highlights ‘damping off’, one of the most common in vegetables production, and which is a consequence of fungi as *Pythium* spp. The replacement of peat by compost and their biological extracts with suppressive activity could ensure the crop production. Furthermore, this replacement could improve the final quality, being one of the most important aspect the final nitrate content, which could be reduced due to the gradual release of nutrients. Finally, this substrate could control this type of pathogens.

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

### **Resumen**

En España la producción de hortalizas “baby leaf” se realiza principalmente en suelo. No obstante, en los últimos años se está empezando a ensayar el cultivo de “baby leaf” en bandeja, donde se requiere un buen sustrato de cultivo que garantice un buen crecimiento de las mismas. La producción de lechuga “baby leaf” en bandejas se realiza habitualmente empleando turba como sustrato orgánico. Su empleo lleva implícito el que las plantas se vean afectadas por enfermedades que perturban el crecimiento y la calidad del cultivo. Entre ellas, destaca el “damping off”, una de las más comunes en la producción de hortalizas, causada por hongos como *Pythium* spp. La utilización de compost o sus extractos biológicos con actividad supresiva reemplazando el uso de turbas, podría permitir una mejora en la producción del cultivo, una mejor calidad del mismo, al reducir el contenido de nitratos, además controlar este tipo de patógeno.

**Palabras clave:** *Lactuca sativa* L.; supresividad; damping off.

## 1. INTRODUCCIÓN

El beneficio de la aplicación de compost en agricultura sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo tanto a corto, como a largo plazo, así como la mejora en la producción y calidad de los cultivos está bien documentada [8-9]. Además, estos pueden ser usados como sustratos de cultivo, siguiendo las reglas establecidas por la legislación española sobre sustratos de cultivo (RD 865/2010), sustituyendo parcialmente a la turba [2]. El uso de compost posee además un valor añadido, el carácter supresivo que presentan frente a diferentes patógenos [6]. Los materiales de partida, la madurez de los compost, su composición y actividad microbiana son características importantes que pueden determinar esta supresividad [3]. Los extractos biológicos de compost también denominado té de compost, son ampliamente empleados en agricultura por dos razones, como fuente de nutrientes [1] y como efecto supresor de diferentes patógenos de plantas, como mildiu, *pythium* y *sclerotinia* [5] favoreciendo de esta manera una reducción de fertilizantes y plaguicidas químicos. Los suelos también tienen la capacidad de resultar supresivos frente a algunas enfermedades [11].

Por otro lado, en las últimas décadas se ha producido una serie de transformaciones en los hábitos de consumo a nivel mundial que han propiciado que hoy en día exista una gran demanda de los productos vegetales de la cuarta gama. El SE español (Murcia y Almería) es uno de los principales productores europeos. Dentro de estos productos se encuentran las hortalizas de hoja pequeña “baby leaf”, la producción se realiza principalmente en suelo, donde son sembradas y recolectadas mecánicamente. En estos últimos años se está empezando a ensayar el cultivo de baby leaf en bandeja, donde se requiere un buen sustrato de cultivo que garantice un buen crecimiento de las mismas. Existen diversos tipos de producción en bandejas según el aporte de la solución nutritiva (en contacto con la solución nutritiva durante un periodo variable de tiempo, llamado sistema Ebb-and-Flow o en contacto permanente, sistema Floating-System) [4] o el tipo de bandeja de poliestireno expandido; bien las de alveolos, o tipo “styrofloat”, donde los alveolos han sido sustituidos por fisuras tronco-cónicas de muy poco volumen, que limitan al máximo la utilización del sustrato.

La producción de plantas en cultivo en bandejas/suelo puede verse afectada por enfermedades que perturban al crecimiento y la calidad del cultivo. El “damping off” es una de las más comunes en la producción de hortalizas y está causada por hongos como *Pythium* spp., *Phytophthora* spp. y *Rhizoctonia solani*. Las plantas pueden ser atacadas por este hongo antes de germinar o después, produciéndose un amarilleamiento de las hojas, doblamiento del tallo y finalmente la muerte de la planta. El control de la enfermedad no es fácil, y se utilizan principalmente fungicidas. No obstante, algunos compost pueden tener un efecto supresor de la incidencia de *Pythium* en plantas [7].

Un aspecto importante en la calidad de las hortalizas de hoja pequeña para cuarta gama es el contenido final de nitratos, regulada por el Reglamento de la UE 1258/2011. Tesi and Lenzi [10] observaron que el uso de fertilizantes de liberación lenta produce una reducción del contenido de nitratos en las plantas, por lo que la utilización de compost o extractos de los mismos podría favorecer la reducción de nitratos debido a su forma gradual de liberación de nutrientes. Por otro lado, la lechuga es una hortaliza con un elevado valor nutritivo. Los cultivares de hoja pequeña muestran mejores características para ser usada como producto de IV gama, destacando la roja por su contenido en potasio y hierro, así como, por su contenido en vitaminas (folatos, betacaroteno, vitaminas C y E) y flavonoides.

El futuro de la producción agrícola en IV gama pasa por una mejora tecnológica lo suficientemente elevada para asegurar el aprovechamiento de los recursos y mantener una menor dependencia y presión sobre los recursos naturales (suelo, agua, etc.), que es donde se centran los objetivos que se persiguen.

El presente proyecto tiene como objetivos incorporar compost sorprendidos y sus extractos biológicos, procedentes de la industria agroalimentaria, para el cultivo de lechuga de hoja pequeña para su uso en IV gama, tanto en bandeja como en suelo, que nos permita profundizar en los mecanismos de supresividad frente a *Pythium*, evaluar sus efectos sobre la planta mejorando la calidad, que en este caso es la parte consumida, y la relación supresividad-compost-suelo-planta.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo a desarrollar estará compuesto de una serie de trabajos en campo seguido por trabajos en el laboratorio

### 2.1 Bioensayos de supresividad de los compost y extractos biológicos en la producción de lechuga en bandeja y en suelo en invernadero

Se seleccionarán dos compost y sus extractos biológicos, que presenten mayor capacidad supresiva frente a *Pythium irregulare* en lechuga, permitiendo un crecimiento de la planta sin causar inhibición de ningún tipo. Se realizará cultivo en suelo y en bandeja en invernadero. Se realizarán tres replicas por tratamiento. El grado de supresividad de los distintos tratamientos se llevará a cabo evaluando la incidencia del grado de infección de las plantas. Estos resultados se implementarán con la cuantificación molecular del patógeno, análisis genómico y metabólicos de los sustratos y análisis metabólicos de la planta.

### 2.2 Influencia del compost, del extracto biológico y modo de aplicación (flotación y microaspersión) en la producción de lechuga sobre bandejas de alveolos y "styrofloat"

Se ensayarán dos tipos de bandeja: alveolos y tipo "styrofloat", en la cual los alveolos son sustituidos por fisuras troncocónicas de muy poco volumen. Las bandejas se rellenarán con los compost y el sustrato habitual de crecimiento (tuba). Se emplearán los sistemas de riego (flotación y microaspersión) con agua y solución nutritiva en mol. L<sup>-1</sup>: NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 7.2; NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 4.8; H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, 2.0; K<sup>+</sup>, 6.0; Mg<sup>2+</sup>, 1.5; Ca<sup>2+</sup>, 2.0. El modo de aplicación del extracto biológico se realizará por flotación y microaspersión. La unidad de muestra será una mesa de 135 cm × 125 cm × 20 cm (media mesa) y cada mesa contendrá 4 bandejas. Se harán tres repeticiones por tratamiento. En el momento de la cosecha (3-4 hojas verdaderas) se medirá, el peso fresco y seco de la parte aérea, número de hojas por planta, área foliar, color y contenido relativo en clorofila de las hojas, así como el número de ramificaciones, se analizará también la densidad y el volumen de raíces.

### 2.3 Estudio de la influencia del tipo de riego y del tipo de bandeja en la calidad del producto

Parte de la producción obtenida de los ensayos realizados, cultivo en suelo y en bandejas será utilizada para determinar el contenido de compuestos anti-nutricionales (nitratos y oxalatos), el contenido de los principales iones (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>), así como los principales compuestos salúferos, el contenido de fenoles totales, flavonoides, capacidad antioxidante total y el contenido en vitamina C.

### 2.4 Estudio de la influencia del tipo de riego y del tipo de bandeja en la vida útil

Empleando el material vegetal generado en los ensayos se llevará a cabo un protocolo cuya finalidad es conservar el material vegetal a 5°C durante una semana. Se realizarán las siguientes determinaciones: cambios diarios en las presiones parciales de O<sub>2</sub> y de CO<sub>2</sub> dentro de las bolsas; recuentos microbianos (mesófilos aerobios totales y microorganismos psicrótróficos cultivados en recuento en placa de agar); deshidratación (pérdida de peso); cambios de color con un colorímetro (Minolta) y un análisis sensorial determinando los principales parámetros de calidad.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de los estudios llevados a cabo nos permitirán evaluar; primero, qué tipo de bandeja (de alveolos y de fisuras) es la más adecuada para el cultivo de lechuga “baby leaf”; segundo, si el empleo de compost supresivos tiene un efecto similar en suelo que en bandeja; tercero, si presenta algún efecto diferenciador el modo de aplicar los extractos biológicos; cuarto, si afecta el modo de aplicación (compost o extracto biológico) a los patrones de supresividad del patosistema. Así mismo, con la utilización de compost o té de compost conocer si favorece no solo la producción de cultivo de lechuga “baby leaf”, sino la calidad del mismo.

### 4. CONCLUSIONES

Con la incorporación de compost y extractos biológicos con efecto supresivo se espera obtener una alternativa a la turba permitiendo sistemas de producción más sostenibles, reduciendo los niveles de fertilizantes y plaguicidas químicos, mejorando la calidad del cultivo de lechuga “baby leaf” y reduciendo la acumulación de ciertos compuestos “anti nutricionales” (nitratos y oxalatos).

### 5. AGRADECIMIENTOS

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

### 6. REFERENCIAS

- [1] Arancon N.Q., Edwards C.A., Dick R., Dick L. 2007. Vermicompost tea production and plant growth impacts. *Bio Cycle*. 48 (11): 51-52.
- [2] Blaya J., Lloret E., Ros M., Pascual J.A. 2014. Identification of predictor parameters to determine agro-industrial compost suppressiveness against *Fusarium oxysporum* and *Phytophthora capsici* diseases in muskmelon and pepper seedlings. *J. Sci. Food Agric.* 95(7): 1482-1490.
- [3] Castaño R., Borrero C., Avilés M. 2011. Organic matter fractions by SP-MAS 13C NMR and microbial communities involved in the suppression of *Fusarium* wilt in organic growth media. *Biol. Control*. 58: 286-293.
- [4] Cros V., Nicola S., Fernández J. A., Martínez J. J., Carreño S. 2003. Cultivo de hortalizas en bandejas flotantes: Sistema de riego y control de la solución nutritiva. *Revista Agrícola Vergel*. 268: 20-26.
- [5] Diáñez F., Santos M., Boix A., de Cara M., Trillas I., Avilés M., Tello J.C., 2006. Grape marc compost tea suppressiveness to plant pathogenic fungi: role of siderophores. *Compost Sci Land Ut*. 14: 48-53.
- [6] Hadar Y., Papadopoulou K.K. 2012. Suppressiveness of composts: microbial ecology links between abiotic environments and healthy plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 50: 133-153.
- [7] Pascual J.A., García C., Hernández T., Lerma S., Lynch J.M. 2002. Effectiveness of municipal waste compost and its humic fraction in suppressing *Pythium ultimum*. *J. Sci. Food Agric.* 44(1): 59-68.
- [8] 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. Arg. Food Syst.* 22(4): 307-315.
- [9] 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 composts. *Soil Biol. Biochem.* 38 (12): 3443-3452.
- [10] Tesi R., Lenzi A. 1998. Controlled-release fertilizers and nitrate accumulation in lettuce (*Lactuca sativa L.*) *Agricultura Mediterranea*. 128(4): 313-320.
- [11] Weller D. M., Raaijmakers J. M., Gardener B. B. M., Thomashow L. S. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40: 309-347.

## Geographic Information System and Remote Sensing applied to the estimation of the plant water status

### Aplicación de Sistemas de Información Geográfica y teledetección a la estimación del estado hídrico de una planta

C. Castillo<sup>1</sup>\*, J.M. de la Rosa<sup>1</sup>, A. Pérez-Pastor<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). Dpto. Producción Vegetal. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203. Cartagena (Murcia). <sup>2</sup>Dirección completa de las distintas afiliaciones de los autores

\*cgg91982@gmail.com

#### **Abstract**

The importance of Geographic Information Systems (GIS) at handling managing geospatial data, is demonstrated in a large number of scientific and professional disciplines that have an impact on the territory. Thus, in agriculture, it is a transversal tool that include the recompilation of: (i) geographic information: soil-plant geolocated sensors in experimental fields, water and fertilizers consumption for each irrigation sector, energy consumption and digital surface models (ii) representation and analysis: obtaining temperature maps, aspect models, solar radiation, run-off and salinity, as well as hardware, software and the people who compose it, results in the optimization of resources (goods, energy and workforce) what it makes the farm more efficient and more beneficial for the environment. In addition, in this project, the use of new technologies, such as satellite imagery or drones with multispectral cameras, allow to obtain other parameters that are not observed with the naked eye, like the state of the crop in spectroradiometric terms (remote sensing).

**Keywords:** Geolocation; maps; agriculture.

#### **Resumen**

La importancia de un Sistema de Información Geográfica (SIG) a la hora de gestionar datos geoespaciales, queda demostrada en una gran cantidad de disciplinas científicas y profesionales que tienen un impacto en el territorio. Así, en agricultura, se trata de una herramienta transversal que engloba la recopilación de: (i) información geográfica: sensores suelo-planta geolocalizados en las parcelas experimentales, consumo de agua y fertilizantes para cada sector de riego, consumo de energía y modelos digitales del terreno (ii) representación y análisis: con la obtención de mapas de temperatura, orientaciones, radiación solar, escorrentía y salinidad, así como el hardware, software y las personas que lo componen, tiene como resultado la optimización de recursos (consumibles, energéticos y mano de obra) lo que hace a la finca más eficiente y más beneficiosa para el medio ambiente. Además, en este trabajo el uso de nuevas tecnologías tales como imágenes de satélite o drones dotados de cámaras multiespectrales, permiten obtener otros parámetros que no se observan a simple vista, como es el estado del cultivo en términos espectrorradiométricos (teledetección).

**Palabras clave:** Geolocalización; mapas; agricultura.

## 1. INTRODUCCIÓN

La Región de Murcia es la huerta de Europa, sus números así lo corroboran, según ECONET en 2016 el valor de las exportaciones ascendieron 2.676M€, estos números indican la importancia que tiene este sector en la economía de esta Comunidad Autónoma.

Sin embargo, la escasez de agua que se registra en el Sureste español hace que este sector se vea muy comprometido en los próximos años [1-2] debido al desequilibrio existente entre los limitados recursos hídricos y la elevada demanda hídrica. Por lo tanto, la programación del riego debe ser precisa, y esto requiere estrategias para optimizar la productividad del agua de riego [3].

El uso de UAV (vehículos aéreos no tripulados) en el sector de la agricultura, es una tecnología en auge gracias a los avances tecnológicos, la reducción de costes y también en la disminución del tamaño de los sensores relacionados con el Sistema de Posicionamiento Global (GPS), sensores ópticos y desarrollo de los vuelos preprogramados [4]. Esta tecnología permite la detección temprana de estrés hídrico utilizando métodos no destructivos [5]. Las principales ventajas que se encuentran con esta tecnología son: i) La resolución temporal, porque se puede adquirir las imágenes en el día y la hora que se establezca; ii) Resolución radiométrica, se van a evitar las interferencias que producen las nubes o cualquier otro agente en suspensión en la atmósfera (como aerosoles), dado que las alturas de vuelo para la toma de imágenes no van a superar los 120m que marca la legislación actual [6]; iii) y por último la resolución espacial, los sensores actuales pueden obtener precisiones de cm/pix.

Son numerosos estudios los relativos a agricultura de precisión con sensores remotos [7], estos datos, que en la actualidad suscitan un gran interés [5] deben ser correlacionados con medidas del estado hídrico suelo-planta como pueden ser potencial hídrico de tallo, conductancia estomática o índice de área foliar [8-9-10], ya que los resultados obtenidos mediante tratamiento de imagen pueden mostrar variaciones dependiendo del tipo de cultivo, edad del cultivo, tipo de suelo, tipo de riego, etc.

Todos los datos recopilados de los sensores remotos así como los parámetros suelo-planta que se encuentran geolocalizados, pueden geoprocesarse en un SIG, en él, se pueden establecer relaciones que son representadas en mapas digitales, pudiendo obtener mapas de zonificación de la fertilidad del suelo, la escasez de agua, la falta de oxígeno, la vulnerabilidad a la erosión e impedimentos para la mecanización.

Es por ello que el presente trabajo trata de presentar las bases de una tesis doctoral que tendrá por finalidad y objetivo principal la optimización de recursos hídricos utilizando nuevas tecnologías.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Condiciones experimentales

El estudio, que se inició en julio de 2016, se desarrolla en una parcela de naranjo (*Citrus sinensis cv Lane late*) de una finca comercial “La Hornera”, situada en el término municipal de la Vega del Segura (38.114296 N, -1.175707W). La parcela tiene una superficie de 5 ha y presenta una pendiente media del 5% y un suelo profundo y de textura franco-arcillosa. Los naranjos, injertados sobre *Citrus macrophila* y con madera intermedia de limón fino 49, tienen 12 años de edad, están colocados a un marco de plantación de 7x2.5 m y presentan un porcentaje de cobertura foliar próximo al 30 %.

El sistema de riego consta de una línea porta emisores por fila de árboles, con 3 goteros autocompensantes de 4 L·h<sup>-1</sup> por árbol. El agua de riego (del trasvase Tajo-Segura) tiene una conductividad eléctrica baja, en torno a 1 dS·m<sup>-1</sup>. Las prácticas culturales (podas, control de malas

hierbas, tratamientos fitosanitarios, etc.) son realizadas por el personal de la finca comercial con el criterio habitual de la zona.

## 2.2 Tratamientos de riego

Inicialmente se han establecido 4 tratamientos de riego:

- i) Control ( $T_{CTL}$ ). Regado en todo momento en base a sus necesidades hídricas totales, las cuales se determinan a partir de la evapotranspiración potencial de cultivo de referencia ( $ET_0$ ) y los coeficientes de cultivo ( $k_c$ ).
- ii) Riego deficitario controlado leve ( $T_{RDC1}$ ). Regado como  $T_{CTL}$  durante todo el periodo a excepción de los periodos no críticos donde se reduce el riego en un 25 % respecto al riego aplicado en  $T_{CTL}$ .
- iii) Riego deficitario controlado moderado ( $T_{RDC2}$ ). Regado como  $T_{CTL}$  durante todo el periodo a excepción de los periodos no críticos donde se reduce el riego en un 50 % respecto al riego aplicado en  $T_{CTL}$ .
- iv) Tratamiento regado según el criterio de la empresa comercial ( $T_{FINC}$ ).

Los 4 tratamientos están formados por tres repeticiones distribuidos según un esquema de bloques al azar. Cada repetición consta de 3 filas de 7 árboles. Las medidas se realizan en la fila central.

## 2.3 Medidas a realizar

Toma de datos multiespectrales con el sensor Sentera Quad Sensor configurado con 3x 1,2 Mp, cámara con obturador global configurado en la banda estrecha borde rojo (670 nm, 700 nm y 730 nm), y una cámara de 10MP configurado en banda ancha de color RGB.

Medidas de huella espectral con espectrorradiómetro Field Spec 3 capacidad de detección de rango completo (350 nm - 2500 nm) proporciona Vis / recogida de datos uniforme NIR / SWIR en todo el espectro de irradiancia solar.

Medidas de estado hídrico del cultivo. Se monitorizan las fluctuaciones de diámetro de tronco a partir de 6 dendrómetros por tratamiento, se realizan medidas puntuales (cada 1 ó 2 semanas) del potencial hídrico foliar ( $\Psi_F$ ), potencial hídrico de tallo ( $\Psi_T$ ) y temperatura foliar ( $T_F$ ).

Medidas de estado hídrico del suelo, monitorizado a partir de la medida de la tensión matricial del suelo con 3 sensores por tratamiento.

Medidas de crecimiento vegetativo a partir de la monitorización del crecimiento del tronco, de medidas puntuales de perímetro de tronco, medidas de la dimensión de la copa y peso del material vegetal procedente de la poda.

Medidas referentes a parámetros productivos y de calidad de la cosecha tales como la floración, el crecimiento del fruto, la producción

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados esperados en este trabajo son:

- Establecer modelos de comportamiento del estado hídrico del cultivo a partir de las imágenes tomadas con sensores remotos.
- Elaboración de mapas de aplicación para la optimización de insumos (fertilizantes y fitosanitarios) y consumos (agua y energía)
- Desarrollo de nuevos índices sensibles al estado hídrico del cultivo.



#### 4. AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo será financiado a través del proyecto: Irriman Life+ / Implementation of efficient irrigation management for a sustainable agriculture LIFE13 ENV/ES/000539

#### 5. REFERENCIAS

- [1] S.G. Garcia-Galiano, P. Olmos-Giménez, J.D. Giraldo-Osorio Assessing nonstationary spatial patterns of extreme droughts from long-term high-resolution observational dataset on a semiarid basin (Spain) *Water*, 7 (10) (2015), pp. 5458–5473
- [2] T.F. Stocker, D. Qin, G.K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex, P.M. Midgley IPCC climate change 2013: the physical science basis Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Inter HG Jones, RA Vaughan
- [3] S. Tapsuwan, J.E. Hunink, F. Alcon, A. Mertens-Palomares, A. Baille. (2014) Assessing the design of a model-based irrigation advisory bulletin: the importance of end-user participation *Irrig. Drain.*, 64: 228–240
- [4] JAJ Berni, PJ Zarco-Tejada, L. Suárez, E. Fereres. Thermal and narrowband multispectral remote sensing for vegetation monitoring from an unmanned aerial vehicle. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing*, 47 (3) (2009), pp. 722-738
- [5] Teledetección de la vegetación: Principios, Técnicas y Aplicaciones Oxford University Press Inc., Nueva York (2010) governmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press, Cambridge, UK/New York, NY, USA (2013)
- [6] BOE del viernes 17 de octubre de 2014, Sección 6.ª Aeronaves civiles pilotadas por control remoto, artículos 50 y 51 [http://www.seguridadaerea.gob.es/media/4389070/ley\\_18\\_2014\\_de\\_15\\_octubre.pdf](http://www.seguridadaerea.gob.es/media/4389070/ley_18_2014_de_15_octubre.pdf)
- [7] J. Gago, C. Doutheb, R.E. Coopmanc, P.P. Gallegoa, M. Ribas-Carbob, J. Flexasb, J. Escalonab, H. Medranob. UAVs challenge to assess water stress for sustainable agriculture. *Agricultural Water Management*. Volume 153, 1 May 2015, Pages 9–19
- [8] C.C. Lelong, P. Burger, G. Jubelin, B. Roux, S. Labbé, F. Baret. Assessment of unmanned aerial vehicles imagery for quantitative monitoring of wheat crop in small plots. *Sensor*, 8 (5) (2008), pp. 3557–3585
- [9] V. González-Dugo, P. Zarco-Tejada, J.A. Berni, L. Suárez, D. Goldhamer, E. Fereres. Almond tree canopy temperature reveals intra-crown variability that is water stress-dependent. *Agric. Forest Meteorol.*, 154 (2012), pp. 156–165
- [10] J. Gago, S. Martorell, M. Tomás, A. Pou, B. Millán, J. Ramón, M. Ruiz, R. Sánchez, J. Galmés, M.A. Conesa, J. Cuxart, J. Tardáguila, M. Ribas-Carbó, J. Flexas, H. Medrano, J.M. Escalona High-resolution aerial thermal imagery for plant water status assessment in vineyards using a multicopter-RPAS. First Conference of the International Society for Atmospheric Research using Remotely-piloted Aircraft, (ISARRA), Palma de Mallorca, Spain (2013)

## Alternative water management strategies and his impact on the soil biology quality in semiarid agroecosystem

## Estrategias alternativas de manejo del riego y su impacto en la calidad biológica del suelo en agroecosistemas semiáridos

J. Abadía<sup>1,2\*</sup>, F. Bastida<sup>1</sup>, E. Nicolás<sup>2</sup>

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

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

\*jabadia50@hotmail.com

### **Abstract**

**In semiarid regions, water is a limiting factor for the agricultural production and hence for his economic development. Indeed, climate change scenarios show that water availability will be reduced on the long run, with a similar level of demand. Therefore, it is important to implement alternative irrigation managements in order to palliate water deficit without affecting soil sustainability. Moreover, the soil microbial community is an essential part of the ecosystem and a sensitive indicator of soil fertility. In this study, the responses of soil microbial community, plant physiology and production to alternative water managements and water deficit were evaluated in Mediterranean agroecosystems.**

**Keywords:** Enzyme activities; Microbial biomass; Wastewaters; Regulated deficit irrigation.

### **Resumen**

**En las regiones de clima semiárido, el agua es un factor limitante para la producción agrícola y, por tanto, para su desarrollo económico. Además, los escenarios de cambio climático muestran una reducción a medio plazo de los recursos hídricos con un mismo nivel de demanda. Por todo ello es fundamental implementar estrategias de riego dirigidas a paliar, en la medida de lo posible, la escasez de agua y a gestionar de manera más eficiente los escasos recursos disponibles. Por otra parte, la comunidad microbiana del suelo es un componente fundamental del ecosistema y un indicador claro de fertilidad del suelo. En el presente estudio se evalúa la respuesta de la comunidad microbiana del suelo, así como la fisiología y producción vegetal, ante las diferentes estrategias de manejo del agua de riego y el déficit hídrico.**

**Palabras clave:** Actividad enzimática; Biomasa microbiana; Aguas regeneradas; Riego deficitario controlado.

## **1. INTRODUCCIÓN**

La escasez de agua en las regiones semiáridas del sureste español es un factor que puede limitar la sostenibilidad de su agricultura y comprometer, por tanto, su desarrollo futuro. Por todo ello es fundamental implementar estrategias de manejo del agua de riego destinadas a paliar en la medida de lo posible dicha escasez de recursos [1,2].

Sin embargo, no sólo el agua es un recurso limitante en áreas Mediterráneas del sureste español. En estas zonas, los suelos suelen ser frágiles y se caracterizan por tener un bajo contenido de materia orgánica y estar sometidos a una agricultura intensiva desde hace décadas, así como a unas condiciones climáticas muy limitantes [3,4]. En este escenario, el uso inadecuado del recurso-suelo puede provocar su degradación. Por tanto, se hace necesario el empleo de indicadores sensibles que nos permitan conocer anticipadamente los cambios de calidad que el suelo puede sufrir debido a las prácticas agrarias utilizadas.

En este sentido, los parámetros relativos a la comunidad microbiana edáfica son muy sensibles a los cambios en la calidad y sostenibilidad del suelo por acciones antrópicas [5,6]. Además, los estudios centrados en la comunidad microbiana del suelo son cruciales puesto que los microorganismos son en gran parte responsables de muchas de las funciones del suelo, entre las que destaca la producción de alimentos, el ciclo de los elementos, la depuración de contaminantes, etc. [7].

Actualmente, en España se reutilizan 408 hm<sup>3</sup> año<sup>-1</sup> de aguas regeneradas (13% del total de agua disponible), de los cuales se destinan a riego agrícola el 79% (320 hm<sup>3</sup> año<sup>-1</sup>), siendo la zona del Levante español la que utiliza más de la mitad (57%) del agua regenerada en España. Cabe destacar que la Región de Murcia aprovecha el 100% de las aguas regeneradas para regadío (~100 hm<sup>3</sup> año<sup>-1</sup>), lo que supone el 17% de los recursos renovables de la Cuenca del Segura, si se incluye la dotación de agua trasvasada, y el 13% del total de agua utilizada en el regadío murciano [8]. La utilización inadecuada de aguas regeneradas puede conllevar riesgos para la agricultura, ya que suelen tener una concentración de sales (Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> y B) superior a la que se encuentra en los recursos hídricos naturales, que no se alteran por el proceso de depuración, pudiendo afectar a las propiedades físico-químicas del suelo. Sin embargo, contienen macronutrientes (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> y K<sup>+</sup>) y sustancias orgánicas difícilmente mineralizables que pueden resultar positivas al utilizarse como abono [1]. Sin embargo, no existe una información muy amplia sobre el impacto que el uso de aguas regeneradas, así como otras estrategias alternativas de riego tales como el riego deficitario controlado (RDC), pueden tener en la sostenibilidad del sistema suelo-planta [9,10].

Los objetivos de este trabajo son evaluar el impacto que el manejo alternativo del agua de riego, así como su déficit, tienen en la calidad biológica del suelo y en sus relaciones con la fisiología y producción vegetal en diferentes agroecosistemas Mediterráneos. Como herramienta para estimar la calidad biológica, se llevará a cabo una evaluación exhaustiva de aspectos relacionados con la comunidad microbiana y su funcionalidad. Entre las estrategias de manejo del agua que se estudiarán, cabe citar el riego deficitario controlado (RDC) y la utilización de aguas regeneradas. Ambas alternativas están focalizadas a paliar las deficiencias hídricas en la cuenca del Segura.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se realizarán en varias fincas situadas en la Región de Murcia, incluyendo cultivos de cítricos en Campotéjar (Molina de Segura), frutales de hueso y pepita (Jumilla) y almendro y tomate (Moratalla).

### 2.1 Diseños experimentales y tratamientos de riego

Los tratamientos de riego aplicados en los experimentos de campo serán de dos tipos para cada uno de los distintos orígenes del agua de riego: uno denominado “tratamiento control”, en el que se satisfacen las máximas necesidades hídricas del cultivo (100% ET<sub>c</sub>), y otro denominado “RDC (riego deficitario controlado)”, con idéntica dotación que el tratamiento control durante todo el año excepto durante la segunda fase de acumulación de solutos y azúcares en el fruto, en la que se riega al 50% de la ET<sub>c</sub> con el objeto de conseguir un déficit hídrico moderado. Se marcaron tres árboles y sus respectivas réplicas para cada parcela regada con aguas de distinto

origen y manejo. En definitiva, los tratamientos de riego a realizar son: i) agua procedente del Trasvase Tajo-Segura con una conductividad eléctrica de 1.1 dS m<sup>-1</sup>; ii) agua regenerada (EC = 3.21 dS m<sup>-1</sup>) procedente de una EDAR de la zona; iii) riego con agua del Trasvase excepto en la segunda fase de desarrollo donde se aplicó un RDC; y iv) riego con agua regenerada excepto en la segunda fase de desarrollo donde se aplicó un RDC.

Otro de los diseños experimentales que constituyen parte de este trabajo consiste en la inducción del déficit hídrico en condiciones de laboratorio en muestras de suelo procedentes de distintos manejos agrarios. Así, se utilizarán suelos sometidos a regadío (tomate), secano (almendro), abandonados y natural (forestal). Los suelos proceden de la misma finca, situada en Moratalla, y, por supuesto, bajo los mismos condicionantes microclimáticos. En laboratorio, las muestras de suelos fueron procesadas y pre-incubadas al 60% de la capacidad de retención hídrica (CRH). Seguidamente, se impuso un déficit hídrico consistente en el 20% de la CRH. Este esquema experimental permite evaluar el impacto que la interacción “uso del suelo-déficit hídrico” tiene en la comunidad microbiana edáfica, a nivel de actividad, biomasa, diversidad y mineralización de la materia orgánica.

## 2.2 Análisis químico y evaluación de la comunidad microbiana edáfica

Para cada muestra de suelo y sus réplicas se realizó un análisis químico de iones, midiendo además el pH y la conductividad eléctrica. El contenido en C orgánico total y N fue analizado, junto con fracciones lábiles de la materia orgánica (C hidrosoluble). La actividad enzimática del suelo se determinó midiendo en laboratorio la actividad de la ureasa, fosfatasa y  $\beta$ -glucosidasa, enzimas relacionadas con el ciclo del N, P y C, respectivamente. Además, se evaluó la actividad microbiana mediante la medida del CO<sub>2</sub> (mineralización) del suelo tanto en campo como en laboratorio (Tabla 1). La biomasa microbiana se evaluó mediante la extracción y cuantificación de ácidos grasos fosfolipídicos (PLFAs). La actividad y diversidad de la comunidad microbiana y sus poblaciones fue analizada mediante técnicas moleculares basadas en metaproteómica.

## **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Con los diseños experimentales propuestos, se pretende ampliar nuestro conocimiento sobre los procesos microbianos que gobiernan la sostenibilidad del sistema-suelo planta en agroecosistemas sometidos a diferentes estrategias de manejo del riego. El uso anual de agua regenerada o en combinación con agua del trasvase favorece la biomasa microbiana y las actividades enzimáticas relacionados con el ciclo del C, N y P en cultivos de pomelo. Sin embargo, los suelos cultivados con mandarino fueron más sensibles al uso de aguas regeneradas. Además, de forma preliminar, el riego con aguas regeneradas mejora la capacidad de resiliencia de la comunidad microbiana.

## **4. CONCLUSIONES**

Este trabajo pone de manifiesto la importancia del uso de aguas regeneradas y el riego deficitario controlado en la sostenibilidad del sistema suelo-planta de agroecosistemas Mediterráneos. Se pretende publicar los resultados de esta investigación en revistas de elevado índice de impacto para obtener los correspondientes índices de calidad y finalizar de este modo la Tesis Doctoral.

## **5. AGRADECIMIENTOS**

Se agradece la financiación recibida del Ministerio de Economía y Competitividad, Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientada a los Retos de la Sociedad AGL2014-54636-R y AGL2016-77282-C3-1.

## 6. REFERENCIAS

- [1] Pedrero F., Maestre-Valero J.F., Mounzer O., Alarcón J.A., Nicolás E., 2014. Physiological and agronomic mandarin trees performance under saline reclaimed water combined with regulated deficit irrigation. *Agric. Water Manag.* 146: 228-237.
- [2] Nicolás E., Alarcón J.J., Mounzer O., Pedrero F., Nortes P.A., Alcobendas R., Romero-Trigueros C., Bayona J.M., Maestre-Valero J.F., 2016. Long-term physiological and agronomic responses of mandarin trees to irrigation with saline reclaimed water. *Agric. Water Manag.* 166: 1-8.
- [3] López Bermúdez F., Albaladejo J., 1990. Factores ambientales de la degradación del suelo en el Área mediterránea. In: *Soil Degradation and Rehabilitation in Mediterranean Environmental Conditions*, J. Albaladejo, M.A. Stocking, E. Díaz, eds. (CEBAS-CSIC, Madrid, Spain). Pp. 15-42.
- [4] García C., Roldán A., Hernández T., 1997. Changes in microbial activity alter abandonment of cultivation in a semiarid Mediterranean environment. *J. Environ. Qual.* 26: 285-291.
- [5] Dick W.A., Tabatabai M.A., 1993. Significance and potential uses of soil enzymes. In: *Soil Microbial Ecology: Application in Agricultural and Environmental Management*, F.B. Metting, ed. (Marcel Dekker, New York, U.S.A.), Pp. 95-125.
- [6] Bastida F, Zsolnay A, Hernández T, García C. 2008. Past, present and future of soil quality indices: a biological perspective. *Geoderma.* 147:159-171.
- [7] Brussaard L, de Ruiter P.C., Brown G.G. 2007. Soil biodiversity for agricultural sustainability. *Agr. Ecosyst. Environ.* 121: 233-244.
- [8] Iglesias R, Ortega E. 2008. Present and future of wastewater reuse in Spain. *Desalination.* 218: 105-119.
- [9] García-Orenes F., Caravaca F., Morugan-Coronado A., Roldán A., 2015. Prolonged irrigation with municipal wastewater promotes a persistent and active soil microbial community in a semiarid agroecosystem. *Agric. Water Manag.* 149: 115-122.
- [10] Bastida F., Torres I.F., Romero-Trigueros C., Baldrian P., Vetrovsky T., Bayona J.M., Alarcón J.J., Hernández T., García C., Nicolás E., 2017. Combined effects of reduced irrigation and water quality on the soil microbial community of a citrus orchard under semi-arid conditions. *Soil Biol. Biochem.* 104: 226-237.

Tabla 1. Analíticas realizadas.

<b>Actividad enzimática</b>	<b>Método</b>	<b>Referencia</b>
β-Glucosidasa	Absorbancia a 400 nm	Tabatabai y Bremner(1969)
Fosfatasa	Absorbancia a 400 nm	Tabatabai y Bremner(1969)
Ureasa	Absorbancia a 610 nm	Kandeler and Gerber(1988)
<b>Actividad respiratoria</b>	<b>Método</b>	<b>Referencia</b>
Medición de CO <sub>2</sub>	Cromatografía de gases	
<b>Ácidos grasos</b>	<b>Método</b>	<b>Referencia</b>
PLFAs	Cromatografía de gases	Frostegard et al. (1993)
<b>Proteínas</b>	<b>Método</b>	<b>Referencia</b>
Identificación de proteínas	Espectrometría de masas/masas	Bastida et al. (2014)



# POSTER SESSION IV: Agrifood Biotechnology

## Fruticulture of the Region of Murcia and climate change perspectives

## Fruticultura de la Region de Murcia frente a los nuevos escenarios de cambio climático

J. M. Martin-Balsalobre\*, J. Cos-Terrer

<sup>1</sup>Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario 30150. La Alberca (Murcia)

\*julkass195@hotmail.com

### Abstract

**The Region of Murcia is one of the main stone fruit producers. It is located in one of the most vulnerable areas to climate change and it is necessary to develop new models to explain the adaptation of the different stone fruit species so that the productive system can make the right decisions. This doctoral thesis is organized in three chapters: a) the development of new models of chill accumulation, b) the integration of the Geographic Information Systems (GIS) and the adaptation of the different fruit species cultivated in the Region of Murcia and c) the new scenario of fruit growing in the climate change.**

**Keywords:** GIS, Dormancy, Climate change, Chill units, stone fruit.

### Resumen

**La Región de Murcia es una de las principales regiones productoras de fruta de hueso. Está situada en unas de las zonas más vulnerables al cambio climático y es necesario desarrollar nuevos modelos que sean capaces de explicar el comportamiento de las distintas especies vegetales para que el sistema productivo pueda tomar las decisiones de una manera acertada. Esta tesis doctoral se está llevando a cabo en tres capítulos: a) el desarrollo de nuevos modelos de acumulación de frío, b) la integración de los Sistemas de Integración Geográfica (GIS) en la modelización del comportamiento de las distintas especies frutales cultivadas en la Región de Murcia y c) el nuevo escenario de la fruticultura frente a las distintas previsiones de cambio climático.**

**Palabras clave:** GIS, Dormancia, Cambio climático, Unidades de frío, frutales de hueso.

## 1. INTRODUCCIÓN

La Región de Murcia es una de las principales regiones productoras desde el punto de vista frutícola siendo las principales especies cultivadas el melocotonero (392.548 t), albaricoquero (96.029 t), ciruelo (18.555 t) y cerezo (1.982 t). La importancia económica y social de estos cultivos es fundamental para la el desarrollo siendo el principal motor económico de la región. Una de las mayores problemáticas que se pueden presentar en las condiciones de cultivo de la Región de Murcia es la gran vulnerabilidad de la zona frente al cambio climático, que puede afectar significativamente al desarrollo de nuestra agricultura como la conocemos en la actualidad [3, 4, 17].

El Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA) está llevando a cabo programas de mejora genética de cerezo, melocotonero y ciruelo, con el fin de

obtener variedades que se adapten a nuestras condiciones de cultivo [4]. Para conocer el comportamiento y adaptación de una determinada variedad frutal se han desarrollado distintos modelos para realizar la forma de acumular el frío, y en la región de Murcia se está trabajando en la actualidad con los modelos de Modelo Weinberger, Utha y dinámico [5, 6, 7, 8]. Weinberger [9] establece una correlación entre horas frío y la temperatura media de las medias de los meses de diciembre y enero. Es el método más simple de todos, y es ampliamente utilizado para determinar la cantidad de frío necesaria para un determinado frutal. El modelo de Utah [10] supone que la acumulación de frío ocurre en un rango de temperatura entre los 2.5 y 12.5 °C, fuera del cual la acumulación es nula o negativa. Tiene por efectivas las temperaturas entre 2,5 y 9,1 °C, mientras que las de fuera del rango restarían efecto. Y el modelo Dinámico. El mayor efecto lo tiene la temperatura de 6 °C, alcanzando un valor 0 sobre los -2 °C y los 14 °C. La acumulación de frío consta de dos pasos. El primero es reversible, acumulándose un intermediario cuyo nivel se reduce si se producen altas temperaturas. En el segundo paso se produce una fijación estable del producto, inducida automáticamente una vez el intermediario alcanza un nivel crítico [11, 12].

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de esta tesis se organiza en tres capítulos enfocados a modelizar la fruticultura frente a las nuevas situaciones de cambio climático para poder asesorar al sector de las medidas que tiene que tomar.

### 2.1. Desarrollo de nuevos modelos de acumulación de frío.

La fruticultura de la Región de Murcia se desarrolla desde las zonas más cálidas a nivel del mar, hasta las zonas más altas del altiplano y noroeste. En cada zona las condiciones son muy variadas y se están utilizando en la actualidad los modelos de horas bajo 7 °C, Utha y dinámico. Es necesario desarrollar un nuevo modelo que agrupe estos tres para facilitar la interpretación del reposo invernal para técnicos y productores.

Actividades a realizar:

-Análisis de climatología en las principales zonas frutícolas de la Región de Murcia. Descarga e interpretación de datos climatológicos del SIAM y de la AEMET.

-Búsqueda de relaciones entre variables que definan y diferencien las distintas zonas productoras: latitud, longitud, altura, orientación, características climáticas...

-Desarrollo de un modelo general para estimar las necesidades de frío para la Región de Murcia.

- Determinación de las necesidades de frío de variedades de referencia en el sector frutal siguiendo el protocolo de evolución de estados fenológicos y peso de las yemas.

### 2.2. Integración de los Sistemas de Integración Geográfica (GIS) en la modelización del comportamiento de las distintas especies frutales cultivadas en la Región de Murcia.

Las técnicas de sistemas de información geográfica (GIS) están siendo una gran revolución en la denominada agricultura de "precisión". El desarrollo del modelo descrito en el apartado anterior nos permitirá la integración de este sobre mapas o imágenes satelitales, topográficos, de suelos,..., pudiendo disponerse de la información de cómo se acumula el frío en una determinada parcela.

Actividades a realizar:



-Integración en las herramientas GIS del modelo general desarrollado en el apartado anterior para su visualización a través de la web.

-Representación de las fechas de recolección y floración en las distintas en mapas GIS a nivel de variedad.

### 2.3. Escenario de la fruticultura frente a las distintas previsiones de cambio climático.

La Región de Murcia, que se puede considerar laboratorio frente a Cambio Climático, ya que tenemos zonas de cultivo de frutales que van desde el nivel del mar hasta las zonas más altas y con una mayor acumulación de frío.

Actividades a realizar:

-Incorporación de los modelos de acumulación de horas de frío a los posibles escenarios futuros de cambio climático: RCP6-RCP4.5-RCP3PD/RCP2.6 y RCP8.5. ([http://www.oscc.gob.es/es/general/salud\\_cambio\\_climatico/Nuevos\\_escenarios\\_emision\\_RCP\\_s.htm](http://www.oscc.gob.es/es/general/salud_cambio_climatico/Nuevos_escenarios_emision_RCP_s.htm))

## 3. CONCLUSIONES

Los modelos utilizados actualmente en la Región de Murcia no son aplicables en todas las zonas de cultivo, siendo necesario desarrollar nuevos modelos que puedan adaptarse a todas las condiciones climáticas. Este modelo se integrará en un visor GIS para poder representar gráficamente las distintas zonas climáticas y poder incluir en el modelo los posibles escenarios de la fruticultura frente al cambio climático.

## 4. REFERENCIAS

- [1] Campoy J A, Ruiz D, Allderman L, Cook N, Egea J. 2012. The fulfillment of chilling requirements and the adaptation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) in warm winter climates: An approach in Murcia (Spain) and the Western Cape (South Africa). *European Journal of Agronomy*, 37, 43–55.
- [2] Campoy J A, Ruiz D, Egea J. 2011. Dormancy in temperate fruit trees in a global warming context: A review. *Scientia Horticulturae*, 130, 357–372.
- [3] Viti R et al (2010) Effect of climatic conditions on the overcoming of dormancy in apricot flower buds in two Mediterranean areas: Murcia (Spain) and Tuscany (Italy). *Sci Hortic* 124(2):217–224
- [4] Alburquerque N, Garca-Montiel F, Carrillo A, Burgos L. 2008. Chilling and heat requirements of sweet cherry cultivars and the relationship between altitude and the probability of satisfying the chill requirements. *Environmental and Experimental Botany*, 64, 162–170.
- [5] Anderson J L, Richardson E A, Kesner C D. 1986. Validation of chill unit and flower bud phenology models for 'Montmorency' sour cherry. *Acta Horticulturae*, 184, 71–78.
- [6] Egea J, Ortega E, Martín ez-Gómez P, Dicenta F. 2003. Chilling and heat requirements of almond cultivars for flowering. *Environmental and Experimental Botany*, 50, 79–85.
- [7] Ruiz D, Campoy J A, Egea J. 2007. Chilling and heat requirements of apricot cultivars for flowering. *Environmental and Experimental Botany*, 61, 254–263.
- [8] Samish RM (1954) Dormancy in woody plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 5:183–204
- [9] Weinberger JH (1950) Chilling requirements of peach varieties. *Proc Am Soc Hortic Sci* 56:122–128
- [10] Richardson EA, Seeley SD, Walker DR (1974) A model for estimating the completion of rest for Redhaven and Elberta peach trees. *Hortscience* 9(4):331–332
- [11] Saure MC (1985) Dormancy release in deciduous fruit trees. *Hortic Rev* 7:239–300
- [12] Schwartz MD (1999) Advancing to full bloom: planning phenological research for the 21st century. *Int J Biometeorol* 42(3):113–118