



ETSIA

Escuela Técnica
Superior
de Ingeniería
Agronómica

Proceedings of the 9th WORKSHOP ON AGRI-FOOD RESEARCH for young researchers



WiA:20



Universidad
Politécnica
de Cartagena

Proceedings of the 9th WORKSHOP ON AGRI-FOOD RESEARCH for young researchers

WIA.20



Acknowledgements

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

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



Primera edición, 2021
ISBN: 978-84-17853-29-7

Technical Editors / Organizing and Scientific Committee

Dr. Francisco Artés-Hernández (Convener)
Dr. Juan A. Fernández-Hernández
Dr. Raúl Zornoza Belmonte
Dra. María Dolores de Miguel Gómez
Dr. Juan José Alarcón Cabañero
Dr. José Enrique Cos Terror

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



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

Prefaces

As the Convener of the Organizing and Scientific Committee of the 9th Workshop on Agri-Food Research for young researchers (WIA2020), and the Coordinator of the Doctoral Program in Advanced Techniques for Research and Development in Food and Agriculture (TAIDA), I am very proud of all participants despite the worldwide effects caused by the SARS-CoV-2 pandemic during this year.

This WIA was for first time virtually held on July 27th, 2020, with more than 50 TAIDA PhD candidates from the Agri-food sector who presented the main advances of their research activities. It was more international than ever, connecting our young researches from several countries such as Chile, Uruguay, Colombia, Mexico, Tunisia, Morocco, Greece and Spain. Presentations showed a great scientific interest and reflected the outstanding potential of the Research Groups involved in the TAIDA PhD Program. Those Groups belong to several institutions of the Murcia Region (UPCT, CEBAS-CSIC and IMIDA) and to many foreign institutions in where our researches are developing their experiments. It is necessary that PhD candidates acquire the typical skills of a PhD during this formative activity on how to summarize and disseminate their results to a diverse audience in a limited time, as usually happens in the presentations at scientific meetings. The Organizing Committee is very proud of how they have adapted to the situation of presenting remotely and probably attending the first virtual scientific meeting.

FOOD has been a key factor in this crazy stormy period bringing serenity to the whole population, and its supply to consumers with the required quality and safety should has been guaranteed. This has been largely thanks to the investment made in R&D in the Agri-food sector, as well as to the excellent training of the sector technicians. In anticipation of possible future episodes, it will be convenient to invest in R&D and increased the qualification of Agri-food personnel. It will be a safe bet in any country.

Prof. Francisco Artés-Hernández, PhD

Convener of the 9th Workshop on Agri-Food Research (WIA2020)

Universidad Politécnica de Cartagena, Spain

Workshops and conferences are a great opportunity for feedback on the work being carried out by PhD candidates. Comments from the audience are very useful as input to improve not only the article but also the thesis work. A previous preparation is needed to be able to present the research in a structured manner and provide a holistic view of the work. It is also a challenge to present in a limited timeframe and face-to-face with talented and experienced academics. But the benefits despite all this effort are there; networking and getting in touch with other professionals are important reasons for attending these events. Thanks to that, PhD candidates gain valuable insights, contacts and tips to help them advance. Attending these events, one has nothing to lose, only things to gain. In this respect, the Workshop on Agri-Food Research (WIA) has become over the last years an excellent opportunity for PhD students of the Doctoral Program 'Advanced Techniques for Research and Development in Food and Agriculture' (TAIDA) to allow them fruitful discussions and dissemination of their achievements. In the present edition of WIA2020, over the course of three sessions specializing in different themes, with twenty-six doctoral students taking part in them, plus a poster session with contributions from ten more doctoral students, the high quality of the works presented and therefore the success of the event is beyond doubt. The contributions are proof of the high scientific level of the doctoral thesis being produced under the umbrella of the aforementioned doctoral program.

I would like to thank the Committee of the TAIDA Program led by Prof. Francisco Artés-Hernández, the PhD students and their supervisors for their excellent work. The limitations imposed by the pandemic we are experiencing have not been an obstacle to making the event a reality, taking advantage of the new technologies for remote broadcasting. This has been possible thanks to the enthusiasm and effort of all the participants, organizers and doctoral students.

Prof. Pedro Sánchez Palma, PhD

Director of the International Doctoral School- EINDOC

Universidad Politécnica de Cartagena, Spain

As Rector of the Universidad Politécnica de Cartagena it is a pleasure and pride to address these words for the Proceedings of the 9th Workshop on Agri-Food Research for young researchers (WIA2020), an event consolidated after its eight previous editions and an important reference in agri-food research in Europe.

The COVID-19 pandemic has shown that the agri-food industry has great social relevance, because it safeguards the supply of agricultural products and food for the European population. For this reason, we can think that agri-food research and innovation will be essential to maintain the food supply chain in the EU, making it more competitive and sustainable. On the other hand, as social actions are taken aimed at the implementation of the Sustainable Development Goals (SDGs), the key role of agri-food systems stands out. Not only are they essential to ensure food security and better nutrition for the population, food systems are also important to achieve social, economic and environmental goals. In fact, the agri-food system faces enormous environmental challenges in relation to food production and waste, food packaging, transportation, and consumer habits and behavior. This, in turn, involves environmental aspects related to the use of energy, materials and water, as well as greenhouse gas emissions.

The TAIDA doctoral program aims to train scientists and professionals capable of responding to the growing demand for science, research and innovation in the fields that support the agri-food sector, mentioned above and the WIA2020 is a dynamic event that allows to present and discuss new lines of investigation and works related to agri-food research. These presentations show the work carried out in the last year in our School of Agronomic Engineering and our Institute of Plant Biotechnology, which actively contribute to the training of our doctoral students.

I would like to end this preface by thanking Prof. Francisco Artés-Hernández and his team for the work carried out in organizing the workshop. I congratulate them for the high quality of the papers presented by researchers from our university and other institutions, such as CEBAS-CSIC and IMIDA, integrated into the TAIDA doctoral program. Also, I congratulate all of our PhD candidates and their directors and encouraged them to continue their stimulating research work.

Prof. Beatriz Miguel Hernández PhD

Rector of the Universidad Politécnica de Cartagena, Spain

INDEX

ORAL SESSION I: Food Technology and Engineering

Inactivation of <i>Salmonella typhimurium</i> by cold plasma activated water application	
M. Clemente-Carazo*, S. Borroug, P. Bourke	11
Prediction of total polyphenols content of cocoa extracts from the CIElab color space	
E. Acosta-Otálvaro*, J.C. Mazo-Rivas, C. García-Viguera	15
Effect of pulses electric fields technology on phytochemical extraction from radish sprouts	
A. Abellán*, G. Dimopoulos, E. Dermesonluoglu, P. Taoukis, D.A. Moreno, C. García-Viguera	19
Antifungal activity of a thymol-based active packaging system for tomato preservation	
M.H. Alvarez-Hernández*, G.B. Martínez-Hernández, N. Castillejo, J.A. Martínez, F. Artés-Hernández	23
Influence of sweeteners intake in anthocyanins metabolism in humans	
V. Agulló*, R. Domínguez-Perles, C. García-Viguera	27
Effect of cooking broccoli florets in microwave-bags on the retention of bioactive compounds	
E. Paulsen*, D.A. Moreno, P. Lema	31
Shelf-life analysis of scFOS produced by commercial FTase enzymes	
M.J. Sánchez-Martínez*, S. Soto-Jover, V. Antolinos, A. López-Gómez	35
Calafate berry extracts encapsulated by spray-drying and stability assessment	
M.E. Romero-Román*, M.D. Lopez, C. García-Viguera, P.S. Fernandez	39
ORAL SESSION II: Plant Production Technology and Engineering and Agro-food Economy	
Circadian rhythms of plant water indicators in citrus	
A.B. Mira-García*, W. Conejero, J. Vera, M.C. Ruiz-Sánchez, C. Romero-Trigueros, J.M. Bayona, P.A. Nortes, J.J. Alarcón, E. Nicolás	44
Effect of the use of nitrification inhibitors on the growth and production of 'Iceberg' lettuce	
P. Berríos*, A. Pérez-Pastor	48
Changes in the photosynthetic capacity of cherry trees during drought-recovery cycles	
P.J. Blaya-Ros*, R. Torres Sánchez, V. Blanco Montoya, R. Domingo Miguel	52
Physiological behavior of pepper rootstocks versus nematodes	
A. Gálvez*, F.M. Del Amor, C. Ros, J. López-Marín	56
Irrigation protocols in table grapes according to irrigation water availability	
A. Temnani-Rajja*, A. Pérez-Pastor	60
Designing and developing of computer-based techniques for helping agronomical research and precision farming	
M. Forcen*, N. Pavon, J.A López, A. Pérez	64

Effect of salinity and resistance induction using methyl jasmonate on growth and phytochemical properties of sea fennel

M. Hatim Labiad*, M. Carmen Martínez-Ballesta, A. Giménez, J.A. Fernández, M. Tabyaoui, C. Egea-Gilabert..... 68

Effect of UV-B light on hypocotyl growth during red cabbage seed germination

N. Castillejo*, L. Martínez-Zamora, P.A. Gómez, F. Artés, F. Artés-Hernández 72

Inheritance of resistance to acrinathrin in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae)

J. Abellán*, V. Quinto, E. Fernández, C. Grávalos, D. Cifuentes, P. Bielza 76

Importance of packaging for the application of the Circular Economy in the Agri-Food Industry

J.M. Donate-Hernandez*, M.D. de-Miguel 80

ORAL SESSION III: Agrifood Biotechnology and Agroforestry Engineering

Influence of edaphic factors, vegetation and bacterial composition on the sustainability of phytomanagement at semiarid mine tailings

Y. Risueño*, C. Petri, H.M. Conesa..... 85

Methodology to determine infiltration rates in agricultural soils based on weighing lysimetry

L. Ávila-Dávila*, M. Soler-Méndez, C.F. Bautista-Capetillo, J. González-Trinidad, J.M. Molina-Martínez 89

Changes in bacterial and fungal communities under extended organic and conventional management

J. Cuartero*, M. Ros, J.A. Pascual, J.M. Vivo 93

Mathematical methods to analyze growth and movement phenotypes

M.V. Díaz-Galián*, F. Perez-Sanz, J.D. Sanchez-Pagán, J. Weiss, M. Egea-Cortines, P.J. Navarro 97

Influence of feedstock and additives in 23 added-value composts as a component of the growing media with *Pythium irregulare* suppressivity

A. Hernández-Lara*, M. Ros, J.A. Pascual 101

Long-term impact of sustainable land management practices on soil bacterial community in an almond orchard in south Spain

O. Ozbolat*, J. Cuartero, M. Ros, J.A. Pascual, M. Egea, R. Zornoza..... 105

A new patented portable weighing lysimeter for horticultural crops supervision

J.A. Nicolás-Cuevas*, D. Parras-Burgos, L. Ruiz-Peñalver, J.M. Molina-Martínez..... 109

Effect and evolution of organic amendments application on the functionality of metallic mine tailings soils in environments under Mediterranean climate

A. Peñalver-Alcalá*, J. Álvarez-Rogel, M.N. González-Alcaraz..... 113

POSTERS SESSION

Safe wastewater reuse in agriculture. Emerging contaminants and risk assessment

D. Bañón*, L. Ponce, J.J. Alarcón..... 118

Inhibition of ethylene production in broccoli by essential oil vapors released from active packaging A. Navarro-Martínez*, G.B. Martínez Hernández, A. López-Gómez.....	122
Epidemiology and molecular characterization of the main aphid-borne virus infections in cucurbits: Effect of mixed infections on the genetic diversity of viral populations M.P. Rabadán*, P. Gómez, M. Juárez	126
New functional low-sugar and rich in bioactive compounds beverage. Optimisation of the process F.J. Salar*, P.S. Fernández, C. García-Viguera	130
Enhancement of bioactive compounds of sprouts during self-life by combined abiotic stresses A. Daoud*, L. Martínez-Zamora, F. Artés-Hernández	134
Evaluation and prioritization of biological risk in Ready-To-Eat (RTE) meat products through mathematical modelling L. Georgalis*, P.S. Fernández, A.P. Garre, A. Psaroulaki	138
Crops association in horticulture to increase agricultural productivity and ecosystem services M. Marcos*, R. Zornoza, V. Sanchez	142
Design of an efficient model to increase shelf life of fruit and vegetable products and reduce food waste in the supply chain A. Cánovas*, E. Hontoria, J.A. Egea, E. Aguayo	146
Relationship of the shelf life of fruits with the content of water and mineral nutrients F.J. Quirante Moya*, M. Carvajal, M.C. Martínez Ballesta	150
Extra virgin olive oil microencapsulation. Effect on quality and shelf life of breaded foods M. Barón-Yusty*, M. Ros-Chumillas, G.B. Martínez-Hernández, A. López-Gómez.....	154

Organizers



Collaborators



ORAL SESSION I:
Food Technology and
Engineering

Inactivation of *Salmonella typhimurium* by cold plasma activated water application

Inactivación de *Salmonella typhimurium* por la aplicación de agua activada por plasma frío

M. Clemente-Carazo^{1*}, S. Borroug², P. Bourke²

¹Departamento de Ingeniería Agronómica, ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena. Spain.

²Plasma Research Group, College of Science and Health, Dublin Institute of Technology, Dublin. Ireland.

*marta.clemente@edu.upct.es

Abstract

Cold plasma is defined as the fourth state of matter and is generated by a series of discharges called Spark and Glow, which originate chemical substances that can interact with microorganisms resulting in the inactivation of these. *S. typhimurium* has been the pathogen of choice for this work, since it is the second serovar of *Salmonella* spp. with more cases of Salmonellosis in 2018. The results provided in this study, showed a clear effect on the inactivation of *S. typhimurium* due to the reactive species generated during PAW treatments.

Keywords: Glow discharge; spark discharge; PAW; reactive species.

Resumen

El plasma frío es definido como el cuarto estado de la materia y es generado por una serie de descargas denominadas Spark y Glow, las cuales originan unas sustancias químicas que pueden interactuar con microorganismos dando lugar a la inactivación de estos. *S. typhimurium* ha sido el patógeno elegido para este trabajo, ya que es el segundo serovar de *Salmonella* spp., con más casos de Salmonelosis en el año 2018. Los resultados aportados en este estudio mostraron un claro efecto sobre la inactivación de *S. typhimurium* debido a las especies reactivas generada durante los tratamientos PAW.

Palabras clave: Descarga brillo; Descarga chispa; PAW; especies reactivas.

1. INTRODUCCIÓN

El plasma es descrito como el cuarto estado de la materia, se trata de un gas ionizado que consiste en moléculas neutras, electrones e iones positivos y negativos (1). Para la generación del plasma se requiere de la administración de un fuerte campo eléctrico que da lugar a la ionización (2). En la actualidad existen dos tipos de descarga para generar plasma: Spark-cuyo “High Voltage” se encuentra debajo de la muestra que va a ser tratada- y Glow-en este caso “High Voltage”, se encuentra directamente en contacto con la muestra que va a ser tratada- (Imagen 1).

Por otro lado, cuando un producto esta siendo tratado con plasma, este esta generando una serie de especie químicas; H₂O₂ y NO₃⁻ con Spark y NO₃⁻ y NO₂⁻ con Glow (3). Estas especies químicas también llamadas “especies reactivas”, tienen capacidad antimicrobiana, por lo que el contacto de estas con algún microorganismo patógeno puede llegar a ser capaces de inactivarlo o reducir su concentración.

En este estudio hemos trabajado con *Salmonella typhimurium*, ya que fue el segundo serovar con más casos de Salmonelosis en el año 2018 con 10.395 en los 28 estados miembros de la UE (4).

El objetivo principal de este proyecto fue conseguir la mayor inactivación de *S. typhimurium* con las distintas aplicaciones de plasma frío.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Microorganismo

Este estudio se ha llevado a cabo, con *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* ATCC 14028, que fue proporcionada por American Type Culture Collection.

2.2 Preparación de las suspensiones

Del cultivo fresco de *S. typhimurium* en TSA (Tryptic Soy Agar), se suspendió una colonia en un tubo con 5 mL de TSB (Tryptic Soy Broth) y se dejó incubar a 37 °C durante 24 h.

Se introdujo 1 mL del cultivo en un tubo Eppendorf que fue centrifugado a 10.000 rpm durante 5 min. El pellet fue resuspendido en PBS (Phosphate Buffered Saline) y de nuevo se centrifugó con las mismas condiciones que anteriormente fueron programadas, este paso se repitió dos veces más.

Finalmente, 30 µL del cultivo fueron diluidos en 970 µL. Esta fue la solución con la que se trabajó en cada experimento con una concentración aproximada de 10⁶ UFC/mL.

2.3 Tratamientos “Plasma Activate Water” (PAW)

Se generó plasma en 10 mL agua destilada, a dos tiempos de tratamiento, 20 y 25 min tanto con Spark, Glow y la combinación de Spark+Glow, en esta última los tiempos fueron divididos para cada una de las descargas. PAW fue recuperada después de los tratamientos en tubos Falcon y estos se pusieron durante 30 min a 37 °C para estabilizar su temperatura.

Una alícuota de 720 µL de PAW (de cada tratamiento) fueron resuspendidos en 80 µL de la suspensión celular preparada anteriormente y se estipularon tiempos de contacto: 0; 2,5; 5; 6; 7,5; 8; 9; 10; 12,5 y 15 min. Posteriormente, 100 µL eran extraídos para cada tiempo y se introdujeron en una placa tipo, Honeywell de 96 pocillos, que contenían (cada pocillo) 30 µL de PBS a pH de 4,5. Finalmente, 20 µL de esta suspensión se mezcló con 180 µL de MRD (Maximun Recovery Diluent) para hacer diluciones seriadas, en este caso las muestras fueron sembradas en TSA de la 0 a la -3, dividiendo la placa en 4 partes y en cada una de ellas se sembraron 3 gotas de 10 µL por cada dilución. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 48 h. Este proceso fue repetido al día 1 de tratamiento para el análisis de PAW.

2.3 Determinación de las especies reactivas.

El análisis de las concentraciones de especies reactivas de plasma en agua se llevó a cabo de acuerdo con Lu et al. (3).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados en Spark 20 min, mostraron un leve efecto antimicrobiano mayor en el día 1 de análisis, pero sin diferencias significativas respecto al día 0. Aún así el límite de detección fue alcanzado antes en el día 1 a los 8 min de tiempo de contacto de PAW y *S. typhimurium* (Fig. 1A). Tal y como muestra la Fig. 1B, en Spark 25 min la inactivación en los primeros min de contacto es diferente a Spark 20 min, ya que en este tratamiento a 25 min la inactivación es ligeramente mayor

en el día 0. Este descenso de la concentración tendió a igualarse para día 0 y 1 en los tiempos de contacto 6, 7 y 7,5. El aumento del tiempo de tratamiento y por tanto la agresividad de este, fue más rápido en alcanzar el límite de detección de 8 min en ambos días. En el caso de Glow 20 min se obtuvo una mayor supervivencia de *S. typhimurium* en el día 1 de análisis, no llegando a obtener una aparente inactivación total de la población a los 5 min para el día 0, como se puede observar en la Fig. 1C. En la generación de plasma con la combinación de Spark y Glow, se consiguió una tendencia de inactivación del patógeno muy parecida, llegando al límite de detección en ambos casos a los 6 min en el día 0 de análisis (Fig. 1D).

Respecto al H₂O₂ (Fig. 2A), como era de esperar solo apareció en Spark, obteniendo un valor mayor en día 0 y en Spark 25 min. La Fig. 2B, representa el NO₃⁻. este también obtuvo un valor superior en el día 0 sin presentar diferencias significativas entre ambos tratamientos de 20 y 25 min, en cambio este se ve muy reducido en el día 1 tanto en Spark y Glow a 25 min. Con relación al NO₂⁻ (Fig. 2C), presenta valores más llevados al contrario que los otros en el día 1 y en Glow 20 min, sigue la misma tendencia en los tratamientos a 25 min de Glow y en la combinación de Spark y Glow.

CAP (Cold Atmospheric Plasma) dispone de distintos mecanismos de acción que causan daño en los microorganismos. En el caso de las especies reactivas respecto de los resultados obtenidos para Spark 20 min, no estarían muy claras las causas de la inactivación, ya que se generó más H₂O₂ y NO₃⁻ en el día 0 y la inactivación fue mayor en el día 1. Una de las explicaciones al respecto puede deberse a la agresividad del tratamiento, ya que a 20 min quizás no fue suficiente para debilitar la célula y poder esta protegerse ante la entrada de estas dos especies reactivas dando lugar a causar algún daño intracelular. Lo contrario pasaría con Spark 25 min (ya que presenta una mayor inactivación en el día 0) en este caso el tratamiento que se aplicó fue mayor, dejando a la célula microbiana más debil y, por tanto, causando algún tipo de daño a nivel de membrana y dando lugar a la formación de poros desprotegiendo a la célula de la entrada de cualquier agente externo, como pueden ser el H₂O₂ y NO₃⁻. Este mismo efecto fue observado también en Glow y la combinación de Spark y Glow 20 min con NO₃⁻. En cambio, en la combinación Spark y Glow 20 min su inactivación también podría verse relacionada con NO₂⁻ ya que no se aprecian diferencias significativas en los días 0 y 1.

4. CONCLUSIONES

Estos resultados microbiológicos y de determinación de las especies reactivas, muestran que, de alguna manera estas, son capaces de reducir o llegar a inactivar *S. typhimurium*, viendo su efecto más marcado en los tratamientos que han resultado más agresivos para este patógeno.

5. AGRADECIMIENTOS

Gracias al MINECO, AEI y FEDER, por la financiación del proyecto "Validación de nuevas herramientas y procesos para el análisis y la mejora de la seguridad alimentaria microbiológica", con cargo a la partida presupuestaria: 30.05.18.80.79 541A 642.10.

6. REFERENCIAS

1. Niemira BA. Cold Plasma Decontamination of Foods. Annu Rev Food Sci Technol. 2012;3(1):125-42.
2. Banu MS, Sasikala P, Dhanapal A, Kavitha V, Yazhini G, Rajamani L. Cold plasma as a novel food processing technology. Int J Emerg Trends Eng Dev. 2012;4(2):803-818.
3. Lu P, Boehm D, Bourke P, Cullen PJ. Achieving reactive species specificity within plasma-activated water through selective generation using air spark and glow discharges. Plasma Process Polym. 2017;14(8):1600207.

4. EFSA 2019. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. EFSA J. 2019;17(12): e05926.

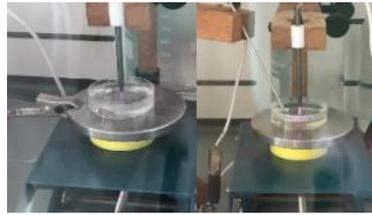


Imagen 1. Modos de descarga, izq. Spark, der. Glow

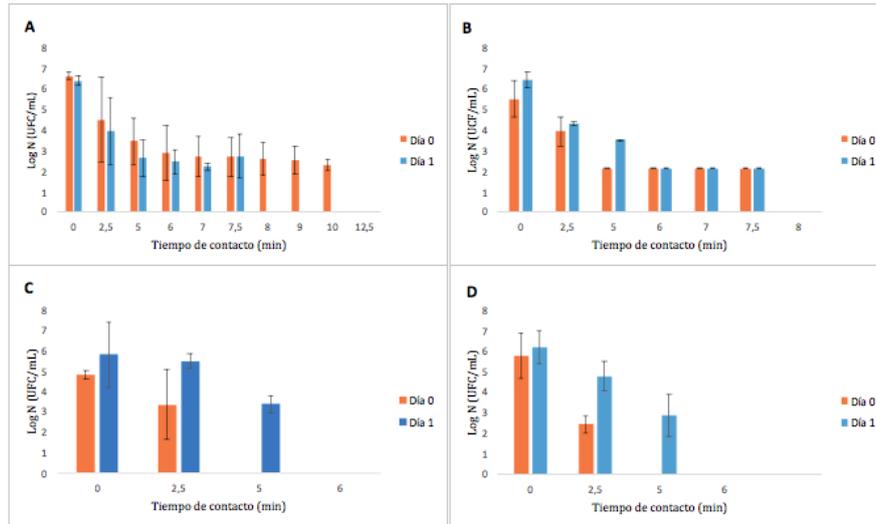


Figura 1. Resistencia de *S. typhimurium* en los tratamientos de PAW, (A) Spark 20 min, (B) Spark 25 min, (C) Glow 20 min, (D) Spark y Glow 20 min

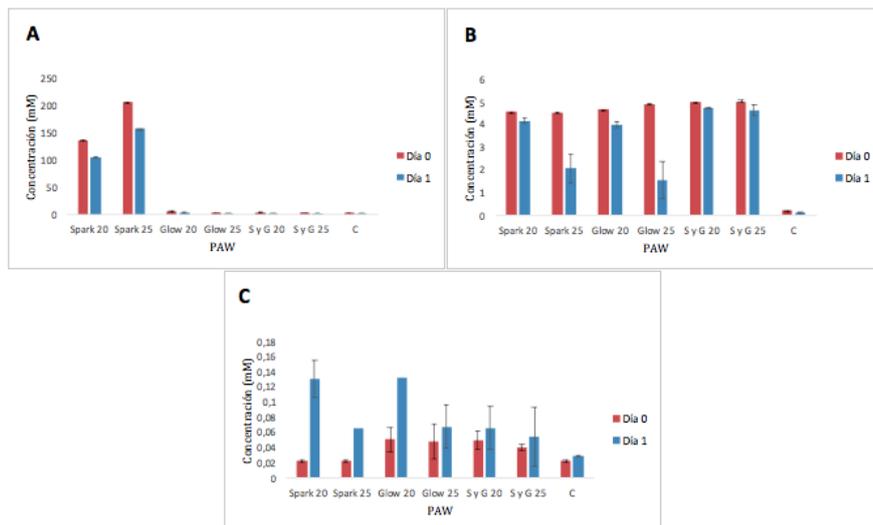


Figura 2. Concentraciones de las especies reactivas de PAW, (A) H_2O_2 , (B) NO_3^- , (C) NO_2^-

Prediction of total polyphenols content of cocoa extracts from the CIElab color space

Predicción del contenido de polifenoles totales de extractos de cacao, a partir del espacio de color CIElab

E. Acosta-Otálvaro^{1*}, J.C. Mazo-Rivas¹, C. García-Viguera²

¹Compañía Nacional de Chocolates S.A.S., Centro de Investigación, Desarrollo y Calidad (CIDCA), Km 2 Vía Belén Autopista Medellín-Bogotá, Rionegro Antioquia. Colombia.

²Laboratorio de Fitoquímica y Alimentos Saludables, Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, CEBAS-CSIC, Campus Universitario de Espinardo, 25, 30100 Espinardo, Murcia. Spain.

*eacosta@chocolates.com.co

Abstract

Cocoa polyphenols are composed of flavanols (catechins, epicatechins, and procyanidins) and anthocyanins. Some compounds generated from reactions between flavanols and anthocyanins are related to the purple colors typical of unfermented beans. Colors such as brownish are the product of oxidation reactions of these compounds with the enzyme polyphenol oxidase or by the effect of temperature. Some techniques for the quantification of polyphenols are complex and sometimes imprecise. This work aimed to propose a mathematical model to correlate the total polyphenol content (TPC) and the color coordinates L^* , a^* , b^* , of three unfermented cocoa extracts. This model was obtained from experimental data and multiple regressions between the variables mentioned above. This represents a tool for the prediction of the SCT in a rapid manner, as a possible indicator of quality in the control of the cocoa extract extraction process. The mathematical models obtained were acceptable as the resulting correlation coefficients were mostly above 0.829 (R^2) and the error values between actual and predicted data were below 5 %.

Keywords: mathematical models; experimental data; predicted data.

Resumen

Los polifenoles del cacao están compuestos por flavanoles (catequinas, epicatequinas y procianidias) y antocianinas. Algunos compuestos generados de las reacciones entre flavanoles y antocianinas se relacionan con los colores púrpura típicos de los granos sin fermentar. Colores como los amarronados son el producto de las reacciones de oxidación de estos compuestos con la enzima polifenol oxidasa o por efecto de la temperatura. Algunas técnicas para la cuantificación de los polifenoles son complejas y en ocasiones imprecisas. Este trabajo tuvo como objetivo proponer un modelo matemático, para correlacionar el contenido de polifenoles totales (TPC) y las coordenadas de color L^* , a^* , b^* , de tres extractos de cacao sin fermentar. Dicho modelo se obtuvo a partir de datos experimentales y regresiones múltiples entre las variables mencionadas anteriormente. Esto representa una herramienta para la predicción del TPC de forma rápida, como un posible indicador de calidad en el control del proceso de obtención de extractos de cacao. Los modelos matemáticos obtenidos fueron aceptables ya que los coeficientes de correlación resultantes, en su mayoría estuvieron por encima de 0,829 (R^2), y los valores de error entre los datos reales y los predichos por debajo del 5 %.

Palabras clave: modelos matemáticos; datos experimentales; datos predichos.

1. INTRODUCCIÓN

Los polifenoles de cacao están compuestos principalmente por flavanoles (catequinas, epicatequinas y procianidinas) y antocianinas (1). El grano de cacao sin fermentar tiene un color púrpura típico el cual puede darse por los compuestos derivados de las reacciones entre las antocianinas y flavanoles, las cuales pueden ocurrir directamente o por la presencia de acetaldehído en el grano de cacao el cual genera un puente etilo entre ambos compuestos (2). Cuando los flavanoles o las antocianinas sufren procesos oxidación por efecto de enzimas como la polifenol oxidasa y o por efecto de la temperatura estos colores pueden tornarse en un color amarronado (3). Existen diferentes técnicas para la cuantificación del contenido de estos compuestos (4-7). La mayoría de estas técnicas son complejas, requieren preparaciones rigurosas de las muestras y no son funcionales desde el punto de vista del control de procesos, ya que no pueden realizarse mediciones en línea en un proceso industrial. Llerena et al. (8), propusieron modelos matemáticos para predecir el contenido de carotenoides, polifenoles totales y antocianinas de diferentes frutos del ecuador a partir de la medición de las coordenadas de color (L^* , a^* , b^*), encontrando una adecuada correlación entre el color de los frutos y el contenido de biocompuestos. Esto es una herramienta simple, que puede permitir el control de un proceso en el que se quiera monitorear el contenido de compuestos bioactivos, a través de una medida indirecta y fácil de monitorear en línea. El objetivo de esta investigación es proponer modelos similares a los propuestos por los autores mencionados anteriormente con el fin de predecir el contenido de polifenoles totales en extractos de cacao a partir de un análisis de color, para establecer si es posible usarlo como un predictor de esta variable, durante el proceso de obtención de dichos extractos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Obtención de extractos de cacao

Las muestras de cacao fueron tomadas aleatoriamente de la granja experimental de Compañía Nacional de Chocolates S.A.S (CNCH) ubicada en el departamento de Támesis, Antioquia. Se tomó un bloque experimental con dos niveles, que corresponden a dos tiempos diferentes de muestreo con una diferencia de 8 meses entre ambos (t_1 y t_2), de mezclas de cacaos sin fermentar ni secar al sol. Estos cacaos fueron recolectados y sometidos a tres tratamientos: A) sin tratamiento/control, B) congelación a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ (9) usando un ultracongelador modelo 3552A (Thermo scientific, Massachusetts, USA) y C) inhibición de la polifenol oxidasa (PPO) de acuerdo a lo descrito por (10-11). Posterior a dichos tratamientos, el cacao fue deshidratado a condiciones controladas en un deshidratador FBA_GFD1850 (Gourmia, Brooklyn, NY) a $45\text{ }^\circ\text{C}$ (Espinoza, 2011), hasta alcanzar una humedad de 8 % aproximadamente, descascarillado en un descascarillador cocoawinnow 240-1-150 (Capco test equipment, Ipswich, UK), desgrasado mediante extrusión, empleando una prensa de tornillo (screw) (CNCH, Medellín, Colombia). Finalmente, se realizó una reducción de tamaño de partícula en un molino (Capco test equipment, Ipswich, UK).

2.2 Análisis de polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales (TCP) se determinó por espectroscopia UV-VIS usando el método a micro-escala de Folin-Ciocalteu (Merk, Darmstadt, Alemania) (6). Todas las mediciones se realizaron por triplicado y se reportaron en sólidos secos de cacao.

2.3 Análisis de color

Para la determinación del color se seleccionó el espacio de color CIELab, obteniéndose las coordenadas luminosidad (L^*), coordenada rojo-verde (a^*) y coordenada amarillo-azul (b^*). Para ello se utilizó el espectrofotocolorímetro ColorFlex EZ modelo 45/0 (HynterLab, Virginia, USA).

Las mediciones se realizaron con iluminante D65. Se efectuaron 3 mediciones para los granos de cada tratamiento.

2.4 Análisis estadístico

Se realizó un modelo de bloques completamente aleatorizado donde el factor principal fue el tratamiento que se compone de tres niveles: A) Sin tratamiento/control, B) congelado y C) inhibición de la PPO, y un bloque con dos niveles (t1 y t2) que corresponden al momento de cosecha del cacao (la diferencia entre los dos bloques fue de 8 meses). Esto fue necesario para eliminar el ruido experimental asociado a las diferencias estacionales de la cosecha. La asignación de los tratamientos a las unidades experimentales traídas en cada evento fue completamente aleatoria. Se realizó un análisis de varianza ANOVA y una prueba de Tukey para establecer diferencias significativas entre los tratamientos. El tratamiento estadístico de los datos se hizo utilizando el lenguaje estadístico R (R Development Core Team, 2019). Adicionalmente se construyeron modelos matemáticos a partir de regresiones múltiples, para la predicción del contenido de polifenoles totales a partir de las coordenadas L^* , a^* , b^* . Esto se realizó siguiendo la metodología propuesta por Tsanova-Savova *et al.* (10).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los modelos construidos se presentan en la Tabla 1, donde es posible observar las ecuaciones matemáticas obtenidas en la regresión y los coeficientes de correlación, los cuales presentan un buen ajuste exceptuando el modelo obtenido para el tratamiento B ($R^2=0,5974$), para los tratamientos A y C se obtuvieron ajustes adecuados ($R^2=0,9999$ y $0,9482$ respectivamente). Llerena *et al.* (8) en un estudio, obtuvieron coeficientes de correlación para la predicción de polifenoles totales en diferentes frutas entre 0,81 y 0,89, lo que nos permite mencionar que los modelos obtenidos en esta investigación tienen un buen ajuste para la predicción de TPC a partir de las coordenadas de color L^* , a^* , b^* . Los modelos obtenidos se validaron a partir de una comparación de los datos experimentales y los predichos por los modelos, adicionalmente se calculó el error absoluto entre ambos como se muestra en la Tabla 2. Llerena *et al.* (8) mencionaron que para el TPC son aceptables niveles de error entre 5-8 %, en los tratamientos A, B y C del t1 se encontraron valores por debajo de este límite, en el t2 los tratamientos B y C se ajustan al límite propuesto, mientras que el tratamiento A estuvo por encima.

4. CONCLUSIONES

Los mejores modelos obtenidos la predicción del TPC a partir de las coordenadas de color L^* , a^* , b^* ; en términos del ajuste y los menores valores de error, fueron los encontrados para los tratamientos A y B en t1 y C en t2. Estos modelos representan una herramienta que permiten predecir de forma rápida y aproximada el TPC de extractos de cacao con el fin de cuantificar esta variable en línea como un parámetro de calidad del extracto durante su proceso de obtención.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento a Compañía Nacional de Chocolates S.A.S por la financiación de este proyecto.

6. REFERENCIAS

- Schinella G, Mosca S, Cienfuegos-Jovellanos E, Pasamar MÁ, Muguerza B, Ramón D, et al. Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed. *Food Res Int.* 2010;43(6):1614–23.
- Sánchez-Ilárduya MB, Sánchez-Fernández C, Garmón-Lobato S, Vilorio-Bernal M, Abad-García B, Berrueta LÁ, et al. Tentative identification of pyranoanthocyanins in Rioja aged red wines by high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Aust J Grape Wine Res.* 2014;20(1):31–40.
- De Aguiar Cipriano P, Ekici L, Barnes RC, Gomes C, Talcott ST. Pre-heating and polyphenol oxidase inhibition impact on extraction of purple sweet potato anthocyanins. *Food Chem.* 2015;180:227–34.
- Cardona L. Influencia del proceso de fermentación sobre las características de calidad del grano de cacao. Universidad Nacional de Colombia [Internet]. 2016 [cited 2019]; 81. Available from: <http://bdigital.unal.edu.co/57686/1/43987710.2017.pdf>
- Quelal-vásconez MA, Lerma-garcía MJ, Pérez-esteve É, Arnau-bonachera A, Manuel J, Talens P. Changes in methylxanthines and flavanols during cocoa powder processing and their quantification by near-infrared spectroscopy. *LWT.* 2020;117:108598.
- Rover MR, Brown RC. Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method. *J Anal Appl Pyrolysis.* 2013;104:366–71.
- Stylos E, Chatziathanasiadou MV, Syriopoulou A, Tzakos AG. Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC – MS/MS) based bioavailability determination of the major classes of phytochemicals. *J Chromatogr B.* 2017;1047:15–38.
- Llerena W, Ang I, Brito B, Ortiz B. Biocompounds Content Prediction in Ecuadorian. *Foods.* 2019;8(284):1–16.
- Gil J. Estabilidad y actividad antioxidante de catequinas presentes en cacaos colombianos durante los procesos de pre industrialización. Universidad de Antioquia [Internet]. 2012; [cited 2019]; Available from: https://pdfs.semanticscholar.org/0dfa/6dd6c35840838da727c314fa4742addc6a6c.pdf?_ga=2.239607681.321630985.1595598092-510555429.1595598092
- Tsanova-savova S, Á FR, Gerova M. (+)-Catechin and (-)-epicatechin in Bulgarian fruits. *J Food Compos Anal.* 2005;18:691–8.
- Toro-Urbe S, Montero L, López-Giraldo L, Ibáñez E, Herrero M. Characterization of secondary metabolites from green cocoa beans using focusing-modulated comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* 2018;1036(7):204-13.

Tabla 1. Modelos matemáticos para la predicción del contenido de polifenoles totales (TPC) en los extractos de cacao.

Tratamiento	b_0	$TPC = b_0 + b_1(L^*) + b_2(a^*) + b_3(b^*)$			R^2
		b_1	b_2	b_3	
A (Control)	106.241	-2.543	17.619	31.142	0.9999
B (Congelación)	93.150	5.972	-18.014	25.533	0.5974
C (Inhibición PPO)	692.930	-32.283	28.706	-2.152	0.9482

Tabla 2. Valores reales, predichos y error absoluto del TPC para los pre-tatamientos de cacao.

Tratamiento	Valor Real (mgGAE/g)	*t1			*t2		
		Valor Predicho (mgGAE/g)	Error absoluto	Valor Real (mgGAE/g)	Valor Predicho (mgGAE/g)	Error Absoluto	
A (Control)	153.06	152.92	0.13	113.64	131.06	17.42	
B (Congelación)	149.14	147.38	1.76	104.19	98.77	5.42	
C (Inhibición PPO)	202.14	201.80	0.33	103.64	103.88	0.23	

*t1 y t2 corresponden al tiempo de cosecha.

Effect of pulses electric fields technology on phytochemical extraction from radish sprouts

Efecto de la tecnología de pulsos eléctricos sobre la extracción de fitoquímicos en brotes de rábano

A. Abellán^{1*}, G. Dimopoulos², E. Dermesonluoglu², P. Taoukis², D.A. Moreno¹, C. García-Viguera¹

¹Laboratorio de Fitoquímica y Alimentos Saludables, Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, CEBAS-CSIC, Campus Universitario de Espinardo, 25, 30100 Espinardo, Murcia. Spain.

²Laboratory of Food Chemistry and Technology, School of Chemical Engineering, National Technical University of Athens, Iroon Polytechniou, 9, 15780 Zografou, Athens. Greece.

*avictorio@cebas.csic.es

Abstract

Pulsed Electric Fields (PEF) is a promising emerging technology, used in the field of food engineering. This treatment can improve the extraction of bioactive compounds from food matrixes among the effect of the electroporation phenomenon. On the other hand, cruciferous sprouts, such as radish (*Raphanus sativus*), are rich in secondary metabolites with interest for the human health (glucosinolates and degradation metabolites: isothiocyanates, as well as phenolic compounds). Due to all the previously mentioned, pulsed electric fields could be a promising extraction technique for such bioactive compounds from radish sprouts.

Keywords: Radish sprouts; bioactive compounds; extraction.

Resumen

Los pulsos eléctricos (PE) son una tecnología emergente muy prometedora, cada vez más empleada en el campo de la industria alimentaria. En este sentido, este tratamiento puede mejorar la extracción de compuestos bioactivos de diferentes matrices alimentarias, mediante el efecto del fenómeno de electroporación. Por otro lado, los brotes de crucíferas como el rábano (*Raphanus sativus*), son ricos en metabolitos secundarios con un gran interés en la salud humana (glucosinolatos y sus productos de degradación: isotiocianatos, así como compuestos fenólicos). Debido a todo ello, los PE podrían ser una tecnología prometedora para la mejora de la extracción de fitoquímicos como los GLS en brotes de rábano.

Palabras clave: Brotes de rábano; compuestos bioactivos; extracción.

1. INTRODUCCIÓN

Las tendencias nutricionales de los consumidores se han ido transformando con el paso de los años. Cada vez más, la alimentación se ha dirigido hacia una preocupación por la salud, la dieta equilibrada y la elección de alimentos más naturales. Todo esto ha impulsado el consumo de alimentos de origen vegetal, así como de nuevos productos como por ejemplo los brotes, entre ellos los de rábano. Estos alimentos son fuentes importantes de macronutrientes (bajo contenido en hidratos de carbono y alto contenido en fibra, ácidos grasos insaturados y proteínas), así como de micronutrientes (vitaminas y minerales) y compuestos fitoquímicos (compuestos fenólicos y glucosinolatos) (1). Los glucosinolatos (GLS) son tiohidroximatos unidos a una β -D-tioglucofosa y una cadena lateral derivada de R-aminoácido, que definirá la clasificación del GLS (alifático,

indólico o aromático), siendo la glucorafenina (GRE), el glucosinolato (alifático) predominante en los brotes de rábano y responsable de gran parte su bioactividad (2-4). En este sentido, cuando la planta es sometida a un daño, libera al medio celular una enzima denominada mirosinasa, para emplear los GLS como sustrato y generar los isotiocianatos, compuestos bioactivos de gran interés nutricional

En la actualidad, algunas tecnologías emergentes como los pulsos eléctricos (PE) se están aplicando para mejorar la extracción de compuestos fitoquímicos. En referencia a lo anterior, los PE permiten mejorar la transmisión célula-extractante, mediante el fenómeno de electroporación, permitiendo reducir el tiempo de extracción o la cantidad de solvente empleado (5). Durante este estudio, se investigaron los efectos de los PE sobre los GLS de brotes de rábano, tratados con luces LED, con el fin de optimizar el método original de extracción hidrometanólica empleado hasta el momento, que se caracterizaba por la aplicación de altas temperaturas y tiempos elevados, con el fin de acelerar la actividad de la mirosinasa (6).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Germinación y almacenamiento de los brotes

Las semillas de rábano (*R. sativus*) se obtuvieron de la empresa Intersemillas S.A. (Valencia, España). Los brotes se desarrollaron de acuerdo con las condiciones de crecimiento definidas por Baenas *et al.* (7). Todas las muestras se conservaron liofilizadas a temperatura ambiente. Los tratamientos, con luces LED (3 pantallas experimentales de 95,1 W), se realizaron en una cámara de cultivo con condiciones ambientales controladas (humedad 60 % a 25 °C de luz y humedad 80 % a 20 °C, en ciclo de oscuridad. Ciclos de 16 h de luz/8 h de oscuridad) (Equitec, Madrid, España).

2.2 Aplicación de PE

Las muestras liofilizadas y molidas se sometieron a un tratamiento de PE en un sistema a escala piloto (Elcrack-kW, DIL, Quakenbruck, Alemania), establecido en la National Technical University of Athens. Para ello, se empleó una celda (4 cm x 5 cm x 5 cm) con un volumen de 3 mL. Los pulsos se llevaron a cabo con una fuerza de campo eléctrico de 1 a 6,5 kV/cm, y se aplicaron frecuencias de 200 y 500 pulsos eléctricos en 10 s.

2.3 Extracción y análisis de los brotes

Tras la aplicación de los PE, se extrajeron las muestras mediante el método establecido por Baenas *et al.* (6), con modificaciones. El análisis cromatográfico de glucosinolatos se llevó a cabo en un HPLC-DAD Agilent 1269 Infinity equipado con una bomba binaria (modelo G 1312 B), un desgasificador (modelo G 1379 B), un autoinyector (modelo G 131-44510) y un detector de red de diodos, DAD (modelo G 4212 B), controlado por el software Agilent B.02. 02. Para la cuantificación de GLS se empleó la glucorafenina (GRE) como compuesto representativo, empleándose un patrón de sinigrina (empleada para glucosinolatos indólicos) a 227 nm.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos, con las condiciones establecidas en la extracción (70 °C, 30 min.), no mostraron diferencias entre los brotes tratados con PE y el control. Estos parámetros de temperatura y tiempo, aplicados con el fin de desactivar la actividad de la mirosinasa, pueden provocar una rápida saturación del extractante que explicaría la ineficacia del tratamiento con PE. Por otro lado, el estado de la muestra (polvo liofilizado) también puede influir en estos resultados, ya que el material fresco permitiría una mayor facilidad para la transmisión de los PE a través de los tejidos, debido a su contenido en agua, potenciando la electroporación y el efecto del tratamiento (8).

Tras la reducción de la temperatura (25 °C), se logró observar diferencias entre las distintas cinéticas de extracción. De este modo, el tratamiento de los brotes con PE a 500 pulsos permitió obtener una mayor concentración de GRE, y alcanzar el pico máximo significativamente más rápido, en comparación con el control. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas al comparar los brotes tratados con PE a 200 pulsos en 10 s y el control, debido, posiblemente, a una falta de intensidad en el tratamiento (Fig. 1).

Por último, el estudio de las diferentes curvas de extracción permitió acortar el método original establecido (30 min, con una reducción de 10 min) (Fig. 2).

4. CONCLUSIONES

El tratamiento de PE a 500 pulsos en 10 s puede resultar efectivo para evitar altas temperaturas en la extracción de GLS, facilitando así el procesado de muestras. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la mirosinasa puede seguir teniendo actividad enzimática, lo que podría degradar los GLS. Es necesario más investigación para estudiar la actividad enzimática de la mirosinasa y su comportamiento ante los tratamientos de PE a temperaturas relativamente bajas.

Adicionalmente, estos resultados permiten la optimización del tiempo de extracción de GLS establecido en el método original.

Estudios futuros podrían demostrar que la aplicación de esta tecnología sobre el material fresco, permitirían ahorrar los pasos de congelación, liofilización y molienda, previos a la extracción.

5. AGRADECIMIENTOS

Este proyecto ha sido posible gracias al programa SUIT4FOOD, perteneciente al proyecto europeo ERASMUS +, y al laboratorio de Ciencia y Tecnología Alimentaria de la Universidad Tecnológica de Atenas.

6. REFERENCIAS

1. Abellán Á, Domínguez-Perles R, Moreno DA, García-Viguera C. Sorting out the Value of Cruciferous Sprouts as Sources of Bioactive Compounds for Nutrition and Health. *Nutrients*. 2019;11:429. doi:10.3390/nu11020429.
2. Ramirez D, Abellán-Victorio A, Beretta V, Camargo A, Moreno DA. Functional Ingredients From Brassicaceae Species: Overview and Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2020;21:1998, doi:10.3390/ijms21061998.
3. Pagnotta E, Montaut S, Matteo R, Rollin P, Nuzillard JM, Lazzeri L, Bagatta M. Glucosinolates in *Reseda lutea* L.: Distribution in plant tissues during flowering time. *Biochem Syst Ecol*. 2020;90: 104043. doi:https://doi.org/10.1016/j.bse.2020.104043.
4. Li R, Song D, Vriesekoop F, Cheng L, Yuan Q, Liang H. Glucoraphenin, sulforaphene, and antiproliferative capacity of radish sprouts in germinating and thermal processes. *Eur Food Res Technol*. 2017;243:547-54. doi:10.1007/s00217-016-2764-3.
5. Andreou V, Psarianos M, Dimopoulos G, Tsimogiannis D, Taoukis P. Effect of pulsed electric fields and high pressure on improved recovery of high-added-value compounds from olive pomace. *J Food Sci*. 2020;85:1500-12. doi:10.1111/1750-3841.15122.
6. Baenas N, Gómez-Jodar I, Moreno DA, García-Viguera C, Periago PM. Broccoli and radish sprouts are safe and rich in bioactive phytochemicals. *Postharvest Biol Technol*. 2017;127:60-7. doi:https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.01.010.
7. Baenas N, Villaño D, García-Viguera C, Moreno DA. Optimizing elicitation and seed priming to enrich broccoli and radish sprouts in glucosinolates. *Food Chem*. 2016;204:314-19. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.144.

8. Dermesonlouoglou E, Chalkia A, Dimopoulos G, Taoukis P. Combined effect of pulsed electric field and osmotic dehydration pre-treatments on mass transfer and quality of air dried goji berry. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2018;49:106-15. doi:10.1016/j.ifset.2018.08.003.

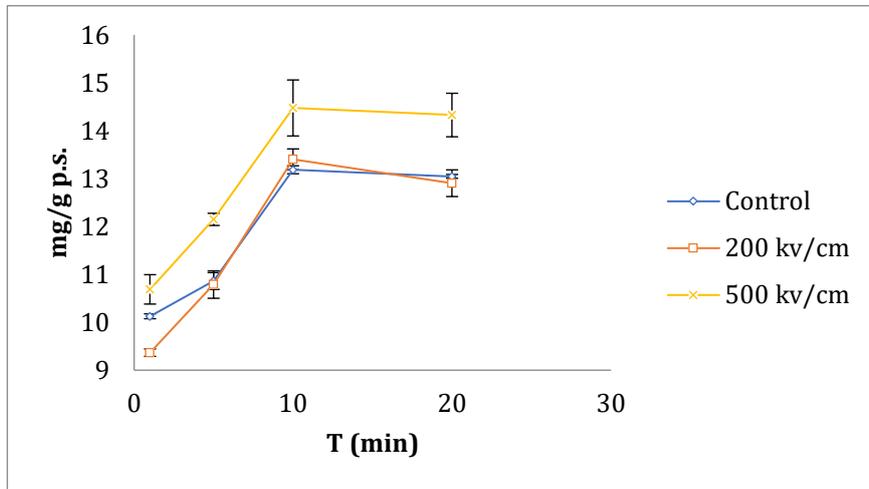


Figura 1. Comparación del Efecto de los PE sobre la extracción de glucorafenina en brotes de rábano a temperatura constante (25 °C) y diferentes tiempos de extracción (1, 5, 10, 15 y 20 min.)

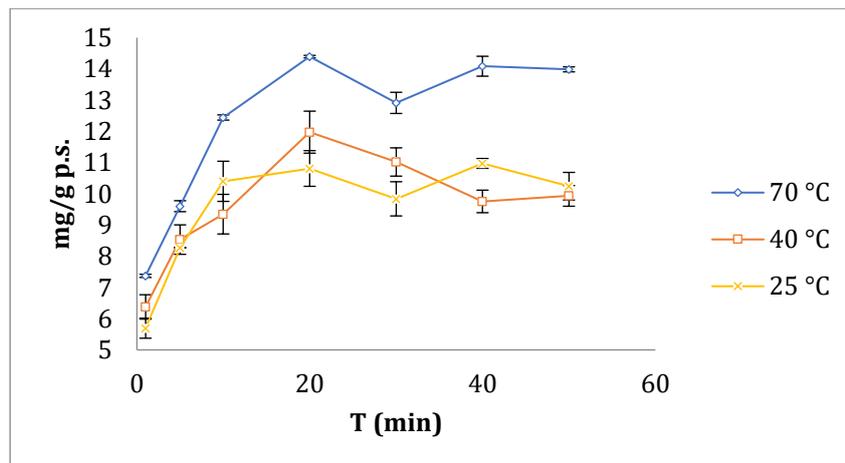


Figura 2. Comparación de diferentes curvas de extracción de glucorafenina a diferentes temperaturas (70, 40 and 25 °C) y tiempos (2, 5, 10, 15, 20, 30, 40 and 50 min.)

Antifungal activity of a thymol-based active packaging system for tomato preservation

Actividad antifúngica de un sistema de envasado activo a base de timol para la preservación de tomate

M.H. Alvarez-Hernández*, G.B. Martínez-Hernández, N. Castillejo, J.A. Martínez, F. Artés-Hernández

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

*hazel.alvarezhdz@gmail.com

Abstract

Tomato fruit is highly nutritious, but it is susceptible to fungal diseases including gray mold caused by *Botrytis cinerea*. In this study, an antifungal sachet-based packaging system was made using Tyvek® film to form the sachet and thymol as the active agent. The effect of the sachet was assayed both *in vitro* against *B. cinerea* growing on PDA medium and *in vivo* to control gray mold on artificially infected cherry tomatoes. According to the assay, inoculated plates or infected fruit were stored at 11 °C inside a packaging system with and without a sachet attached to the lid inner side. The results showed that the prepared sachet was effective at inhibiting the *B. cinerea* growth during the 6 incubation days, with 97 % of inhibition. Furthermore, when the sachet was evaluated during storage of infected tomato, the incidence and severity of decay was reduced, especially from the second day to the day 20 of storage. Thus, this thymol-carrying sachet has a potential application as an antifungal-releasing packaging system for preserving cherry tomato, and probably other fruit and vegetables susceptible to *B. cinerea* infection.

Keywords: *Botrytis cinerea*; antifungal-releasing sachet; essential oils.

Resumen

El tomate es altamente nutritivo, pero muy susceptible a enfermedades fúngicas, incluido el moho gris causado por *Botrytis cinerea*. En este estudio, se elaboró un sistema de envasado antifúngico a base de un sachet utilizando una película Tyvek® para formar la bolsa y timol como agente activo. El efecto del sachet se evaluó *in vitro* contra *B. cinerea* en medio PDA e *in vivo* para controlar el moho gris en tomates tipo *cherry* infectados artificialmente. Según el caso, las placas inoculadas o frutos infectados fueron almacenados a 11 °C en un sistema de envasado con y sin el sachet adherido a la parte interna de la cubierta. Los resultados mostraron que el sachet elaborado fue eficaz para inhibir el crecimiento de *B. cinerea* durante los 6 d de incubación, con un 97 % de inhibición. Además, cuando el sachet fue evaluado durante el almacenamiento del tomate infectado, la incidencia y la severidad se redujeron, especialmente desde el segundo día hasta los 20 d. Por lo tanto, este sachet activo con timol tiene una aplicación potencial como un sistema de envasado antifúngico para preservar tomates tipo *cherry*, y probablemente otros productos hortofrutícolas susceptibles a la infección por *B. cinerea*.

Palabras clave: *Botrytis cinerea*; sachet antifúngico; aceites esenciales.

1. INTRODUCCIÓN

El tomate es una fruta de gran importancia económica a nivel mundial. Particularmente, el tomate *cherry* es una fruta de consumo popular, debido a los beneficios que se han reportado para la salud, así como a sus características sensoriales (1). No obstante, es altamente perecedero y susceptible a enfermedades, principalmente al moho gris causado por *Botrytis cinerea* (2).

Numerosos aceites esenciales de origen vegetal tienen actividad antifúngica contra diversos patógenos postcosecha. Entre estos destaca el aceite esencial de tomillo, cuyo componente principal es el timol (2). El timol es un monoterpenoide que presenta una estructura de un anillo fenólico simple, cuyo poder antimicrobiano ha sido atribuido a la presencia de un grupo hidroxilo y a un sistema de electrones deslocalizado (3). El timol es una sustancia volátil lo cual resulta de gran interés para ser liberado en el espacio de cabeza de un envase alimentario (4). En la última década, el envasado activo ha suscitado gran atención como una tecnología emergente (1). El compuesto activo puede ser incorporado dentro de un dispositivo portador (*sachets* o *pads*), el cual se coloca dentro del envase sin tener contacto con el alimento. En el caso del envasado activo antimicrobiano, el modo de acción se basa en la evaporación de un compuesto volátil con actividad antimicrobiana (4). Así, el objetivo del presente trabajo fue elaborar un *sachet* activo que libere timol y evaluar su actividad antifúngica contra *B. cinerea* tanto *in vitro* como *in vivo*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Elaboración del *sachet* activo, y preparación de material vegetal e inóculo

Se elaboró un sistema de envasado activo utilizando timol (Sigma–Aldrich, Alemania) como agente activo y una película Tyvek® (220 µm de espesor; DuPont, EEUU) para formar una pequeña bolsa (6,0 × 6,5 cm) conocida como *sachet*. Tras introducir 0,57 g de cristales de timol en el *sachet*, esta fue termo-sellada. Como producto se usaron tomates (*Solanum lycopersicum* D'Arcy. 'Dolcetini'), obtenidos de Agrícola Gaobe SL (Almería, España), los cuales fueron higienizados con NaClO (100 mg L⁻¹; pH 6,5).

B. cinerea fue inicialmente aislado de un espécimen de pimiento infectado con moho gris y purificado mediante la transferencia de muestras de agar-micelio (7,4 mm de diámetro) a placas Petri de agar de patata-dextrosa (PDA; Scharlau Chemicals, España) tal como se ha descrito anteriormente (5). Las placas inoculadas se mantuvieron 5 d en luz/oscuridad a 20 °C.

2.2 Efecto *in vitro* del *sachet* preparado en el crecimiento micelial y desarrollo de *B. cinerea*

Fragmentos de agar-micelio (2,2±0,4 cm²) fueron extraídos del cultivo de *B. cinerea* (con 5 d de edad) y sembrados en el centro de placas Petri (90 mm de diámetro) con PDA suplementado con estreptomycin. Se inocularon 4 placas por tratamiento y se colocaron por duplicado dentro de bandejas de polipropileno (PP) rígido sobre una cama de tomates (10 tomates por bandeja) para simular las condiciones atmosféricas que se presentan *in vivo*. Las bandejas fueron cubiertas con una película de PP (35 µm de grosor), la cual tenía un *sachet* adherido en un punto medio del lado interno. Un grupo de placas inoculadas fueron incubadas en ausencia de *sachet* y usadas como control.

Las placas envasadas fueron incubadas a 11 °C con exposición constante a luz, y el crecimiento micelial fue registrado diariamente mediante mediciones del área superficial, hasta que la colonia se encontró próxima al borde de la placa Petri. Adicionalmente, el porcentaje de inhibición de crecimiento fue determinado a partir de la diferencia entre el área de la colonia creciendo en ausencia de un *sachet* y el área de aquella colonia incubada con un *sachet* con timol en el mismo día. El desarrollo fúngico fue caracterizado como la extensión de colonia a través de la tasa de crecimiento: incremento de la superficie cubierta en cm² d⁻¹.

2.3 Eficiencia del *sachet* preparado para controlar la infección por moho gris en tomate

Para evaluar el efecto *in vivo* del *sachet* elaborado, un grupo de tomates higienizados (10 unidades por tratamiento) fueron artificialmente infectados realizando una incisión (2 mm de largo y 1 mm de profundidad) sobre ellos e inoculando 5 µL de una suspensión de conidios de *B. cinerea* ($2,6 \times 10^5$ conidios mL⁻¹). Los tomates fueron colocados en bandejas de PP, las cuales fueron cubiertas como se ha detallado en el subapartado anterior. Como control, un grupo de frutas infectadas fueron envasadas sin *sachet*. El ensayo se realizó a 11 °C durante 26 d. La incidencia y la severidad de podredumbre fue determinada en cada bandeja mediante el índice de podredumbre (ID) usando la siguiente ecuación:

$$ID = \frac{(P_1 \times 0) + (P_2 \times 1) + (P_3 \times 2) + (P_4 \times 3)}{TF} \quad (1)$$

donde P_1 es el número de frutos sin podredumbres, P_2 es el número de frutos deteriorados sin micelio, P_3 es el número de frutos deteriorados con micelio blanco, P_4 es el número de frutos deteriorados con micelio gris, y TF es el número total de frutos en la bandeja.

2.4 Análisis estadístico

Los ensayos se realizaron de acuerdo con un diseño bifactorial (tratamiento × tiempo de conservación o incubación). El efecto de los tratamientos se determinó mediante un Análisis de Varianza usando el programa estadístico SPSS Statistics versión 22 (IBM Corporation, NY, EE.UU.).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El *sachet* con timol mostró eficiencia para inhibir el crecimiento micelial de *B. cinerea* en placas con PDA a 11 °C (Fig. 1A), mostrando una inhibición del 97 ± 2 % al final del periodo de incubación. Tras 5 d de incubación en ausencia de timol, se observó una tasa de crecimiento máxima promedio de aproximadamente 184 cm² d⁻¹ (Fig. 1B). Por el contrario, cuando se usó el *sachet* de timol, la mayor tasa de crecimiento fúngica encontrada fue de alrededor de 8,2 cm² d⁻¹ en el día 6. En concordancia con lo observado *in vitro*, el *sachet* con timol disminuyó la podredumbre del tomate *cherry* causada por *B. cinerea* durante 20 d a 11 °C (Fig. 2). Zhang y col. (2) describieron que el poder antifúngico del timol contra *B. cinerea* se debe a que dicho agente cambia la morfología de las hifas mediante la disrupción y distorsión de los micelios. Dichos autores, también encontraron que el timol afectaba de manera negativa al contenido lipídico de las células de *B. cinerea* y que la permeabilidad de la membrana incrementaba a medida que la dosis de timol aumentaba, causando la destrucción de la membrana celular.

Los resultados obtenidos sugieren que el sistema elaborado en este trabajo fue capaz de liberar timol en concentraciones suficientes para afectar el desarrollo de *B. cinerea* tanto en medio PDA como en tomate *cherry* fresco. En este sentido, se ha encontrado que la concentración fungicida mínima de timol contra *B. cinerea* es de 100 mg L⁻¹ en medio PDA (2). Por ello, la película Tyvek® resulta ser una buena opción para el desarrollo de dispositivos de liberación/emisión de agentes como el timol.

4. CONCLUSIONES

Un *sachet* activo con timol minimizó el crecimiento de *B. cinerea* (*in vitro*) y fue efectivo para reducir la patogenicidad de *B. cinerea* en tomate *cherry*. Por lo tanto, este sistema tiene un alto potencial para ser usado como sistema de envasado activo antifúngico para la preservación de tomate *cherry*. No obstante, será necesario realizar nuevas investigaciones para su optimización, así como su uso para otros productos hortofrutícolas.

5. AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro agradecimiento a Agrícola Gaobe SL por suministrarnos el material vegetal a través de la Cooperativa CASI, y a BIOCONSERVACIÓN S.A (Barcelona, España) por facilitarnos la película Tyvek®. También agradecemos a Roberta Passafiume y Francisca por su ayuda técnica.

6. REFERENCIAS

1. Buendía-Moreno L, Soto-Jover S, Ros-Chumillas M, Antolinos V, Navarro-Segura L, Sánchez-Martínez MJ, et al. Innovative cardboard active packaging with a coating including encapsulated essential oils to extend cherry tomato shelf life. *LWT*. 2019;116:108584.
2. Zhang J, Ma S, Du S, Chen S, Sun H. Antifungal activity of thymol and carvacrol against postharvest pathogens *Botrytis cinerea*. *J Food Sci Technol*. 2019;56:2611-20.
3. Kachur K, Suntres Z. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2020;60(18):3042-53.
4. Kapetanakou AE, Skandamis PN. Applications of active packaging for increasing microbial stability in foods: natural volatile antimicrobial compounds. *Curr Opin Food Sci*. 2016;12:1-12.
5. Martínez JA, Navarro A, Fernández JA, Bañón S. Using paclobutrazol to delay the growth of *Botrytis cinerea* isolated from *Chamelaucium uncinatum*. *Australas Plant Pathol*. 2007;36:39-45.

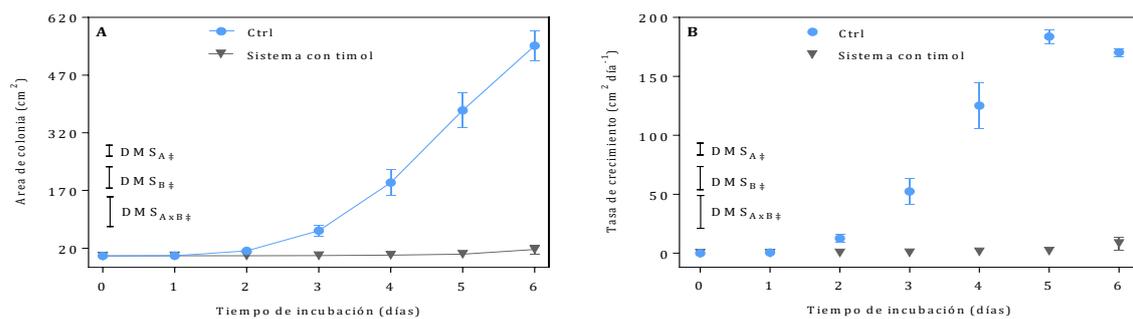


Figura 1. Crecimiento micelial (A) y tasa de crecimiento (B) de *Botrytis cinerea* en placas de PDA a 11 °C con o sin (Ctrl) sachet de timol. Cada punto es el promedio de 4 colonias y las líneas verticales son la desviación estándar. Las letras mayúsculas A y B denotan el sistema de envasado y el tiempo de incubación, respectivamente. DMS: Diferencia mínima significativa; ‡ significancia para $P \leq 0,001$.

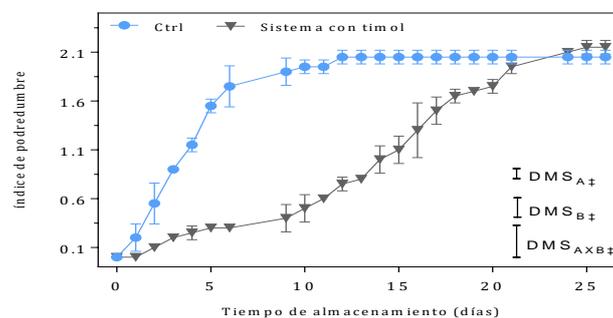


Figura 2. Índice y severidad de podredumbre en tomate *cherry* inoculado con *Botrytis cinerea* y conservado a 11 °C con y sin (Ctrl) sachet de liberación de timol. Las líneas verticales indican la desviación estándar ($n=3$). Las letras mayúsculas (subíndices) A y B denotan el sistema de envasado y el tiempo de almacenamiento, respectivamente. DMS: Diferencia mínima significativa; ‡ significancia para $P \leq 0,001$.

Influence of sweeteners intake in anthocyanins metabolism in humans

Influencia de la ingesta de edulcorantes en el metabolismo de antocianos en humanos

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

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

*vagullo@cebas.csic.es

Abstract

In recent decades, a positive relationship has been demonstrated between the consumption of sugary drinks and the risk of obesity, diabetes and cardiovascular diseases. To reduce the sugar content of foods, while maintaining a pleasant taste, new options have been proposed using alternative sweeteners. In this aspect, this study compares stevia, sucralose and sucrose, added to maqui and citrus beverages, in terms of anthocyanin bioavailability in healthy humans after acute administration. Sucralose was the sweetener that provided higher bioavailability for most anthocyanin-derived compounds, followed by stevia, indicating that they can be two good alternatives to the use of sucrose, a high caloric sweetener overused that promotes some metabolic diseases.

Keywords: stevia; sucrose; sucralose; anthocyanin; bioavailability.

Resumen

En las últimas décadas se ha encontrado una relación positiva entre el consumo de bebidas azucaradas y el riesgo de padecer obesidad, diabetes y/o enfermedades cardiovasculares. Para reducir el contenido en azúcares de los alimentos, manteniendo un sabor agradable, se han propuesto nuevas opciones usando edulcorantes alternativos con baja carga calórica. En este estudio se estableció una comparativa, en términos de biodisponibilidad de antocianos en humanos sanos tras la ingesta en agudo de una bebida de maqui y cítricos, endulzada con estevia, sucralosa o sacarosa. La sucralosa fue el endulzante que proporcionó una mayor biodisponibilidad para la mayoría de los compuestos derivados de antocianos, seguido de la estevia, indicando que pueden ser dos buenas alternativas al uso de sacarosa, un endulzante calórico que interviene en algunas enfermedades metabólicas.

Palabras clave: estevia; sucralosa; sacarosa; antocianos; biodisponibilidad.

1. INTRODUCCIÓN

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

Paralelamente a la búsqueda de alternativas saludables al alto consumo de bebidas azucaradas, existe una necesidad importante de aumentar el consumo de frutas y verduras en la

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

Con el fin de reducir el contenido en azúcares hay una tendencia a buscar otras opciones a través de edulcorantes alternativos no calóricos, aunque existe cierta polémica ya que parece ser que contribuyen a una mayor ingesta calórica y a la obesidad (6). Para determinar la posible actividad o influencia, de los edulcorantes, sobre la asimilación de fitoquímicos bioactivos, en el presente estudio se empleó uno de tipo natural (estevia), y otra alternativa de tipo sintético (sucralosa) en comparación con sacarosa, para la elaboración de una bebida con base de cítricos y maqui.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Diseño experimental

Se realizó un estudio clínico doble ciego, aleatorizado, cruzado en personas con sobrepeso (n=20). El estudio y el protocolo fueron aprobados por el Comité Ético de Estudios Clínicos (CEIC) oficial del Hospital General Universitario Morales Meseguer (Murcia), y registrados en ClinicalTrials.gov (NCT04016337). Después de una fase inicial de 3 d de lavado con una dieta estricta libre de polifenoles y azúcares añadidos, se administraron 330 mL de las bebidas de prueba (edulcorante con estevia, sucralosa y sacarosa) en ayunas. Se recogieron muestras de orina 24 h antes (tiempo 0), así como en los siguientes intervalos: 0-3,5 h, 3,5-12 h, 12-24 h y fueron inmediatamente congeladas (-80 °C). Después de 15 d, el proceso se repitió nuevamente, para cada voluntario que ingirió otra bebida desarrollada con otro de los edulcorantes, hasta que todas las bebidas fueron consumidas por todos los voluntarios (3 rondas).

2.2 Recolección, procesamiento y análisis por UHPLC-ESI-MS/MS de muestras de orina

Las muestras de orina se descongelaron y diluyeron 1:2 (v/v) en agua MilliQ/ácido fórmico (99,9/0,1, v/v) y centrifugaron a 15000 g durante 10 min, a 5 °C (Sigma 1-16, B Braun Biotech International, Osterode, Alemania). Posteriormente, los sobrenadantes se filtraron a través de membranas PVDF de 0,45 µm (Millex HV13, Millipore, Bedford, Mass., EE. UU.) y se almacenaron a -20 °C, hasta el análisis por UHPLC-ESI-MS/MS. La identificación y cuantificación de los metabolitos de antocianos se realizó aplicando el método previamente utilizado por Ludwig et al. con algunas modificaciones (7).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el análisis de orina se determinaron 29 metabolitos fenólicos, derivados de antocianos, aunque 11 de ellos se encontraron en un número reducido de voluntarios, por lo que no son representativos. Por tanto, los metabolitos cuantificados fueron aquellos que se identificaron en todos los voluntarios (CA, CA-glucurónido, CA-sulfato, CAT-sulfato, 3,4-DHPAA, DHPAA-glucurónido, DHPAA-sulfato, HA, HA-sulfato, TFA-glucurónido, TFA-sulfato, THBA-glucurónido, THBA-sulfato, TIFA-sulfato, VA, VA-glucurónido, VA-glucurónido-sulfato y VA-sulfato). Curiosamente, no se detectaron las antocianidinas precursoras (Dp y Cy). Este hecho podría atribuirse a la degradación durante la digestión que forma derivados de glucurono, sulfo o metilo

en el tracto gastrointestinal proximal, aunque un mecanismo para la absorción de glicósidos de antocianos todavía es altamente especulativo (8).

En orina, la cuantificación de los metabolitos de antocianos excretados se desarrolló en orina basal (0 h), así como en orina excretada entre 0 y 3,5 h, 3,5-12 h, y 12-24 h. La cinética de excreción para todos los compuestos coincidió en voluntarios que ingirieron los tres tipos de jugos evaluados, presentando la concentración más alta para todos los compuestos identificados a las 3,5 h después de la ingesta de bebidas (Fig. 1). Por esta razón, todas las concentraciones descritas y analizadas estadísticamente se remitieron al marco 0-3,5 h después de la ingestión.

Otro resultado a destacar es que la sucralosa proporcionó una biodisponibilidad mayor para la mayoría de los compuestos (derivados de CA, CAT, THBA y TIFA, DHPAA-sulfato, HA y VA-glucurónido-sulfato), seguido de la estevia (DHPAA, HA-sulfato y VA-sulfato). La sacarosa no proporcionó una biodisponibilidad notablemente superior de ningún compuesto en comparación con los otros dos. Esto puede deberse a que los portadores de azúcar intestinal pueden desempeñar un papel importante en la absorción de flavonoides (9). Un estudio realizado por Mülleder et al. demostró que la adición de sacarosa en los jugos disminuye la excreción total de antocianos (10).

4. CONCLUSIONES

Los resultados indican que la sucralosa es el edulcorante que proporciona una mayor biodisponibilidad para la mayoría de los metabolitos de degradación provenientes de antocianos, por encima de estevia y sacarosa. Sin embargo, hay algunos casos en los que la estevia también tiene una biodisponibilidad significativamente mayor que la sucralosa y la sacarosa. No obstante, la sacarosa no proporciona mayor biodisponibilidad en ningún caso.

Teniendo en cuenta las diferencias en la biodisponibilidad entre los edulcorantes, este estudio propone dos alternativas de edulcorantes no calóricos (sucralosa y estevia) para reducir el consumo de sacarosa, un edulcorante alto en calorías directamente relacionado con algunas enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2 y la obesidad.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por el MINECO español a través del Proyecto de Investigación AGL2016-75332-C2-1-R, y VA por una subvención del FPI (BES-2017-082424).

6. REFERENCIAS

1. Hu FB, Malik VS. Sugar-sweetened beverages and risk of obesity and type 2 diabetes: epidemiologic evidence. *Physiol Behav.* 2010;100:47-54.
2. Popkin BM. Sugary beverages represent a threat to global health. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(12):591-3.
3. Gonzalez-Molina E, Domínguez-Perles R, Moreno DA, García-Viguera C. Natural bioactive compounds of Citrus lemon for food and health. *NJ Pharm Biomed Anal.* 2010;51:327-45.
4. Gironés-Vilaplana A, Baenas N, Villaño D, Speisky H, Garcia-Viguera C, Moreno DA. Evaluation of Latin-American fruits rich in phytochemicals with biological effects. *J Func Foods.* 2014;7:599-608.
5. Hanhineva K, Törrönen R, Bondia-Pons I, Pekkinen J, Kolehmainen M, Mykkänen H, Poutanen K. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int J Mol Sci.* 2010;11(4):1365-402.
6. Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thaiss CA, Maza O, Israeli D, Zmora N, Gilad S, Weinberger A, Kuperman Y, Harmelin A, Kolodkin-Gal I, Shapiro H, Halpern Z, Segal E, Elinav E. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature.* 2014;514(7521):181-6.

7. Ludwig IA, Mena P, Calani L, Borges G, Pereira-Caro G, Bresciani L, Del Rio D, Lean ME, Crozier A. New insights into the bioavailability of red raspberry anthocyanins and ellagitannins. *Free Radic Biol Med.* 2015;89:758-69. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.400.
8. Kay CD, Pereira-Caro G, Ludwig IA, Clifford MN, Crozier A. Anthocyanins and Flavanones Are More Bioavailable than Previously Perceived: A Review of Recent Evidence. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2017;8:155-80, doi:10.1146/annurev-food-030216-025636.
9. Hollman PC, de Vries JH, van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr.* 1995;62:1276-82.
10. Mülleder U, Murkovic M, Pfannhauser W. Urinary excretion of cyanidin glycosides. *J Biochem Bioph Meth.* 2002;53:61-6.

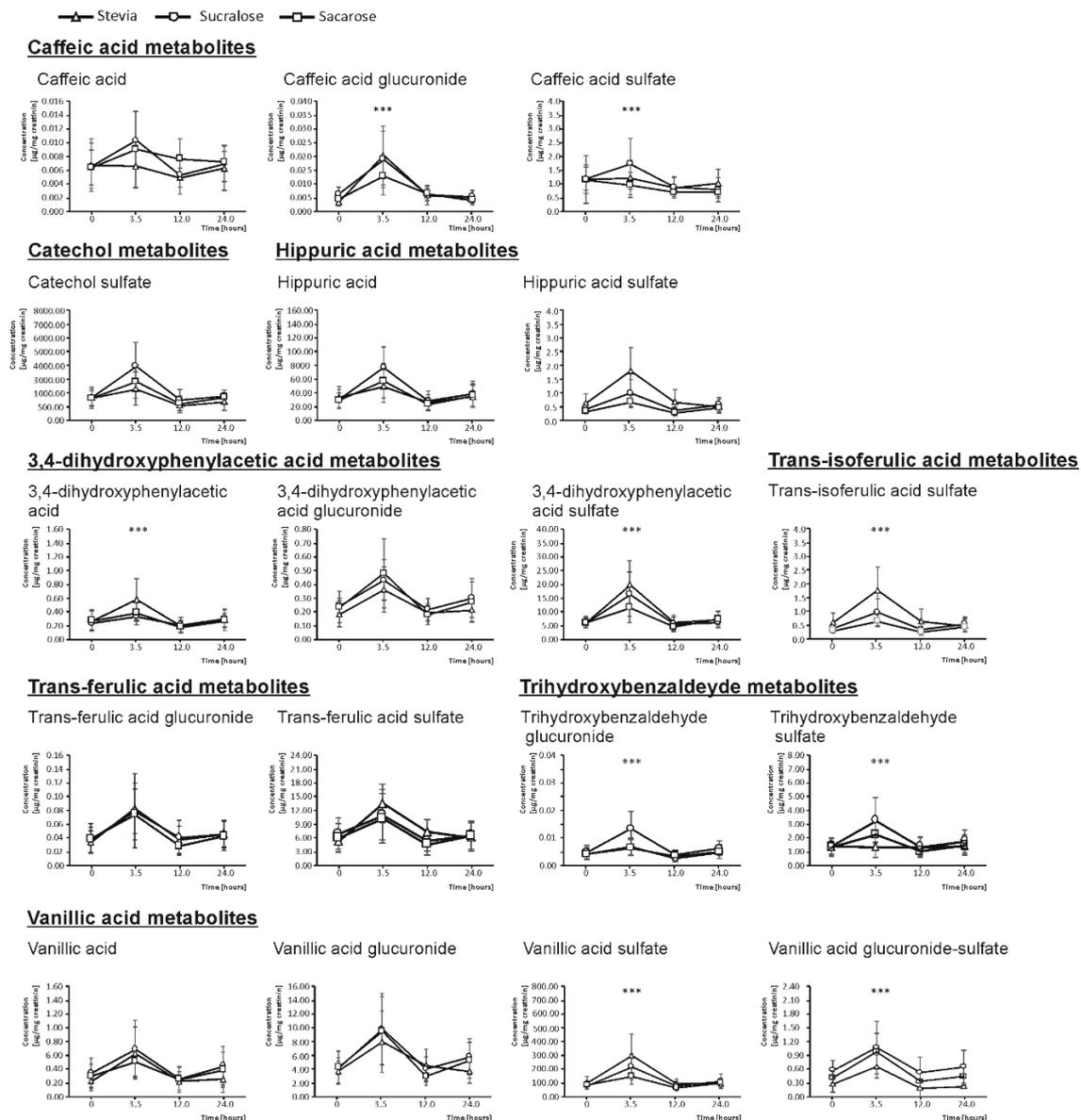


Figura 1. Contenido de metabolitos de antocianinas individuales en orina basal y orina de 3,5, 12 y 24 h de voluntarios sanos después de ingerir 330 mL de jugos de maqui-cítricos desarrollados utilizando edulcorantes como estevia (Δ), sucralosa (\circ) y sacarosa (\square). Se encontraron biodisponibilidades significativamente diferentes según un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de rango múltiple de Duncan en $p < 0,001$ (***)

Effect of cooking broccoli florets in microwave-bags on the retention of bioactive compounds

Efecto del cocinado de floretes de brócoli en bolsas de microondas sobre la retención de compuestos bioactivos

E. Paulsen^{1*}, D.A. Moreno², P. Lema¹

¹Instituto de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad de la República, Julio Herrera y Reissig 565, Montevideo. Uruguay.

²Laboratorio de Fitoquímica y Alimentos Saludables, Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, CEBAS-CSIC, Campus Universitario de Espinardo, 25, 30100 Espinardo, Murcia. Spain.

*erikap@fing.edu.uy

Abstract

Cooking vegetables in microwave-bags has become a popular cooking method; however, information about effect of this emerging cooking method on phytochemicals compounds of vegetables is limited. The aim of this work was to study the effect of microwave-bag cooking vs. traditional microwaving on bioactive compounds content of broccoli florets. Broccoli heads were obtained in a local supermarket, transported to laboratory and processed immediately. Broccoli florets were placed into microwaveable bags and cooked in a domestic microwave oven for 5 min. The product cooked under the same conditions but without using bag, was used as a control (traditional). Broccoli floret samples were taken before and after cooking and lyophilized. Glucosinolates (GSL) and hydroxycinnamic acids (HCAs) contents were analyzed by HPLC-DAD-ESI-MSn. Microwave-bag cooking kept total GSL content ($32.3 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$); while in traditional microwaving significant loss was observed (from 32.0 to $26.4 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$). For both cooking methods, a 40 % reduction in HCAs compared to fresh broccoli was observed. Microwave-bag cooking is a novel method that helps to retain GSL, the major bioactive compounds of broccoli. Furthermore, this option is fast, easy and considerable clean cooking option to fulfill modern consumers' needs.

Keywords: microwave cooking; microwaveable bag; glucosinolates; hydroxycinnamic acids; vegetables.

Resumen

Cocinar verduras en bolsas para microondas se ha convertido en un método muy utilizado por consumidores modernos. Existen escasos reportes acerca su efecto sobre los componentes bioactivos de estos productos. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la cocción en bolsa versus cocción convencional en microondas en el contenido de compuestos bioactivos de floretes de brócoli. Los floretes de brócoli se cocinaron en bolsas para microondas, en un horno de microondas doméstico, durante 5 min (muestras MWB). Producto cocinado en las mismas condiciones, pero sin bolsa se usó como control (Tradicional). Las muestras fueron tomadas antes y después del cocinado. El contenido de glucosinolatos (GSL) y ácidos hidroxicinámicos (HCAs) se analizó por HPLC-DAD-ESI-MSn. Floretes de brócoli MWB preservaron el contenido de GSL totales ($32,3 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$), mientras que los controles presentaron una pérdida significativa de estos compuestos (de $32,0$ a $26,4 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$). En ambos métodos el contenido de HCAs se redujo un 40 % con respecto al producto fresco. El uso de bolsas para microondas es un método novedoso que ayuda a retener el contenido de GSL, principales compuestos bioactivos del brócoli.

Además, es una opción de preparación rápida y limpia que satisface las necesidades de los consumidores modernos.

Palabras clave: cocción en microondas; bolsas aptas para microondas; glucosinolatos; ácidos hidroxicinámicos; hortalizas.

1. INTRODUCCIÓN

El brócoli es un vegetal del género *Brassica* altamente valorado debido a su importante contenido de fitoquímicos promotores de la salud (1,2). Dentro de éstos, los glucosinolatos (GSL) presentan un particular interés debido a su probada actividad anticancerígena e implicación en la reducción del desarrollo de problemas cardiovasculares. Generalmente, este vegetal es cocinado previo a su consumo. Los métodos de cocción inducen importantes cambios en la composición fisicoquímica del vegetal, influyendo en la concentración y biodisponibilidad de componentes de interés como los glucosinolatos (GSL) y compuestos fenólicos. Esto puede comprometer las cualidades funcionales del brócoli, por lo que resulta relevante determinar los efectos de los métodos y condiciones de cocción en el contenido compuestos bioactivos (3).

Son varios los estudios que han evaluado los efectos del hervido, escaldado, cocción al vapor, salteado, horno convencional y horno microondas sobre el contenido de fitoquímicos en brócoli (3,4). Muchos de los resultados reportados en estos estudios son contradictorios y difíciles de comparar, debido a la cantidad de parámetros que se pueden variar dentro de cada método de cocción y también por los métodos de extracción y determinación utilizados (5).

El actual estilo de vida ha convertido el cocinado de vegetales en bolsas para microondas en un método de cocción muy utilizado. Este método se caracteriza por ser rápido, fácil y limpio, ajustándose a las necesidades de los consumidores modernos. Sin embargo, son escasos los reportes acerca del efecto del cocinado en bolsas de microondas sobre componentes bioactivos en matrices vegetales.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la cocción en bolsas para microondas versus cocción convencional en horno microondas en el contenido de glucosinolatos y ácidos hidroxicinámicos de floretes de brócoli.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal y diseño experimental

Pellas de brócoli (*Brassica oleracea* L. [Italica Group] Parthenon) se compraron en un supermercado local, se trasladaron al laboratorio y se procesaron inmediatamente. Los brócolis se cortaron en floretes y se lavaron con agua corriente. Aproximadamente 200 g de floretes de brócoli se colocaron en bolsas aptas para microondas y se cocinaron en un horno de microondas doméstico (MW 213 INOX, TEKA) durante 5 min a una potencia de 800 W (muestras MWB). Producto cocinado en las mismas condiciones, pero sin bolsa se usó como control. Las muestras fueron tomadas antes y después de la cocción. Se congelaron en N₂ líquido y se liofilizaron para su posterior análisis.

2.2 Contenido de glucosinolatos (GSL) y ácidos hidroxicinámicos (HCAs)

La extracción de las muestras se llevó a cabo según Baenas et al. (6). Muestras liofilizadas se extrajeron en metanol (70 % v/v) y se calentaron a 70 °C durante 30 min agitando cada 5 min. Después del calentamiento, las muestras se centrifugaron (15.000 × g, 15 min, 4 °C), se colectó el sobrenadante y se removió completamente el metanol en evaporador rotatorio. El material obtenido se resuspendió en agua ultrapura y se filtró a través de filtros de 0,22 µm.

El análisis cualitativo y cuantitativo de GSL y HCAs se realizó de acuerdo con Baenas et al. (6). La identificación de GSL y HCAs se realizó mediante espectrometría de masas analizando patrones de fragmentación característicos [M-H, MS2, and MS3] en un HPLC-DAD-ESI-MSn (Agilent Technologies HPLC 1200, Waldbronn, Germany acoplado a UltraHCT Bruker Ion Trap, Bremen, Germany). Para la cuantificación de GSL y HCAs se registraron cromatogramas a 227 y 330 nm respectivamente. GSL y HCAs se identificaron siguiendo los espectros UV, orden de elución y patrones de fragmentación. Los GSL se cuantificaron utilizando sinigrina y glucobrassicina (Phytoflan, Alemania) como patrones externos de glucosinolatos alifáticos e indólicos, respectivamente. Los HCAs se cuantificaron utilizando ácido clorogénico y sinapínico como patrones externos (Sigma-Aldrich, Barcelona, España). Los resultados se expresaron como mmol por kilogramo de peso seco (mmol kg^{-1} p.s.).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Contenido de GSL totales

Se encontraron diferencias significativas en el contenido de GSL totales entre métodos de cocción. Floretes de brócoli cocinados en bolsa de microondas presentaron mismo contenido de GSL totales respecto al producto fresco ($32,3 \pm 2,6$ mmol kg^{-1}). Floretes cocinados en microondas (MW) convencionalmente mostraron una reducción significativa del contenido de GLS totales respecto al producto fresco (de $32,0 \pm 2,2$ to $26,4 \pm 1,3$ mmol kg^{-1}). Por lo tanto, el uso de bolsa de microondas permitió mantener el contenido de GSL totales en el cocinado. Varios estudios muestran que la cocción en MW es adecuada para la retención de varios compuestos de interés nutricional (4,7–10). Sin embargo, también se ha informado que la lisis celular y la alta tasa de evaporación en la cocción con MW podrían provocar pérdidas de varios compuestos, incluidos GSL (9). En función de los resultados obtenidos, se sugiere que la mejor conservación de GSL en la cocción en bolsa podría deberse a la reducción de las pérdidas por evaporación.

3.2 Contenido de HACs

Floretes de brócoli cocinados con MW presentaron una reducción del contenido HACs de un 40 % respecto al producto fresco (de $2,52 \pm 0,08$ a $1,52 \pm 0,31$ mmol kg^{-1}), independientemente del tratamiento. Los HACs son compuestos fenólicos que se caracterizan por su baja estabilidad a altas temperaturas. Por esta razón, las pérdidas de HACs se atribuyen a la degradación térmica. Vallejo et al. (11) cocinaron floretes de brócoli en MW (1.000 W, 5 min) obteniendo una disminución del contenido de HACs del 74 %. Estos autores emplearon agua para la cocción y las pérdidas se atribuyeron a fenómenos de lixiviación. Pellegrini et al. (8) cocinaron floretes de brócoli en MW (300 W, 30 min) sin usar agua, y también detectaron grandes pérdidas en el contenido HCAs respecto al brócoli fresco (72 %). Las pérdidas en este caso fueron atribuidas a la degradación térmica debido al extenso tiempo de cocción (7).

4. CONCLUSIONES

La utilización de bolsas para microondas es un método novedoso para cocinar hortalizas, como el brócoli, que mostró retener el contenido de GSL, sus principales compuestos bioactivos. Además, es una opción de elaboración rápida, fácil y limpia, ajustándose al estilo de vida actual.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por la Comisión Sectorial de Investigación Científica, Universidad de la República, Uruguay.

Los autores agradecen a la Agencia Nacional de Innovación e Investigación por otorgarle a Erika Paulsen una beca de doctorado y una pasantía en el Laboratorio de Fitoquímica y Alimentos Saludables del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos del CEBAS-CSIC, Murcia, España (referencia de la beca: POS_EMHE_2018_1_1007740).

6. REFERENCIAS

1. Jia C, Xu C, Wei J, Yuan J, Yuan G, Wang B, et al. Effect of modified atmosphere packaging on visual quality and glucosinolates of broccoli florets. *Food Chem.* 2009;114:28–37.
2. Moreno DA, Carvajal M, Garc C. Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *J Pharmaceut Biomed.* 2006;41:1508–22.
3. Hennig K, Verkerk R. Food science meets plant science : A case study on improved nutritional quality by breeding for glucosinolate retention during food processing. *Trends Food Sci Technol.* 2014;35(1):61–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2013.10.006>
4. Tabart J, Pincemail J, Kevers C, Defraigne JO, Dommes J. Processing effects on antioxidant, glucosinolate, and sulfuraphane contents in broccoli and red cabbage. *Eur Food Res Technol.* 2018;244(12):2085–94.
5. Barakat H, Rohn S. Effect of different cooking methods on bioactive compounds in vegetarian, broccoli-based bars. *J Funct Foods.* 2014;11:407–16.
6. Baenas N, Villaño D, García-viguera C, Moreno DA. Optimizing elicitation and seed priming to enrich broccoli and radish sprouts in glucosinolates. *Food Chem.* 2016;204:314–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.144>
7. Guo Q, Sun DW, Cheng JH, Han Z. Microwave processing techniques and their recent applications in the food industry. *Trends Food Sci Technol.* 2017;67:236–47.
8. Pellegrini N, Chiavaro E, Gardana C, Mazzeo T, Contino D, Gallo M, et al. Effect of different cooking methods on color, phytochemical concentration, and antioxidant capacity of raw and frozen brassica vegetables. *J Agric Food Chem.* 2010;58(7):4310–21.
9. Soares A, Carrascosa C, Raposo A. Influence of Different Cooking Methods on the Concentration of Glucosinolates and Vitamin C in Broccoli. *Food Bioprocess Technol. Food and Bioprocess Technology.* 2017;10(8):1387–411.
10. Xu Y, Chen Y, Cao Y, Xia W, Jiang Q. Application of simultaneous combination of microwave and steam cooking to improve nutritional quality of cooked purple sweet potatoes and saving time. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2016;36:303–10.
11. Vallejo F, Tomás-Barberán FA, García-Viguera C. Phenolic compound contents in edible parts of broccoli inflorescences after domestic cooking. *J Sci Food Agric.* 2003;83(14):1511–16.

Shelf-life analysis of scFOS produced by commercial FTase enzymes

Análisis de vida útil de scFOS producidos por enzimas FTasas comerciales

M.J. Sánchez-Martínez^{1*}, S. Soto-Jover¹, V. Antolinos², A. López-Gómez¹

¹Departamento de Ingeniería Agronómica, ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena. Spain.

²Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario, 30150 Murcia. Spain.

*mjose.sanchez@upct.es

Abstract

The short-chain fructooligosaccharides (scFOS) are oligosaccharides that have a great interest as prebiotics. Fructosyltransferase enzymes (FTases) carry out the production of scFOS by enzymatic hydrolysis of sucrose. These products are used as functional food ingredients and also because of their technological properties. As a part of other foods, they can be included in matrices of different pH and be subjected to different heat treatments during processing or preservation. Therefore, it becomes necessary to study the stability of the scFOS produced under different conditions of temperature and pH.

Keywords: fructooligosaccharides; stability; temperature; pH.

Resumen

Los fructooligosacáridos de cadena corta (scFOS) son oligosacáridos que tienen gran interés como prebióticos. La producción de scFOS mediante hidrólisis enzimática de la sacarosa es catalizada, entre otras, por la enzima fructosiltransferasa (FTasas). Estos productos se usan como ingredientes de alimentos funcionales así como por sus propiedades tecnológicas. Al ser incluidos como parte de otros alimentos los scFOS pueden ser sometidos a diferentes pH y tratamientos térmicos durante el procesado o conservación. En este escenario, es interesante conocer la estabilidad de los scFOS producidos bajo diferentes condiciones de temperatura y pH.

Palabras clave: fructooligosacáridos; estabilidad; temperatura; pH.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el consumidor demanda alimentos y bebidas funcionales que contengan prebióticos y probióticos capaces de proporcionar efectos beneficiosos para su salud. Los FOS se utilizan, generalmente, como componentes de los alimentos funcionales por su carácter prebiótico (1) y representan aproximadamente el 10 % de los edulcorantes naturales comercializados con unos beneficios esperados de 3,52 mil millones USD para 2024 (2).

Los scFOS son oligosacáridos formados por cadenas lineales de D-fructosa unidas por enlaces β (2 \rightarrow 1), con una molécula de D-glucosa terminal unida por un enlace α (2 \rightarrow 1)(3). Estos compuestos pueden ser producidos por transfructosilación de sacarosa mediante las enzimas β -D-fructofuranosidasas (FFasas, EC 3.2.1.26) o transfructosilasas (FTasas, EC 2.4.1.9) (4), dando lugar a FOS de cadena corta (scFOS): 1-kestosa (GF₂), 1-nistosa (GF₃) y 1-fructofuranosil-nistosa (GF₄) (5,6,7). Dentro de las muchas aplicaciones industriales de los scFOS, puede destacarse su

uso como ingredientes de mayonesas ligeras, quesos y embutidos bajos en grasas, productos de panadería y productos cárnicos empanados, contribuyendo a la reducción del contenido calórico y a la retención de agua de los mismos. Debido a que el contenido de scFOS en estos alimentos puede variar entre el 2 % y 50 % (2), es importante llevar a cabo un estudio de la estabilidad de los scFOS bajo determinadas condiciones de procesado, tanto en modelos como en alimentos reales. Temperatura, tiempo y pH, parámetros habituales en la elaboración y conservación de alimentos, han sido estudiados por Courtin et al. (8). Los resultados mostraron que los scFOS eran más sensibles a la descomposición alcalina que los fructooligosacáridos de cadena larga (8). El objetivo del presente trabajo ha sido evaluar la estabilidad de scFOS obtenidos mediante fermentación con FTasa comercial frente a distintas condiciones de pH y diferentes tratamientos térmicos durante el periodo de almacenamiento. Los resultados permitirán validar la idoneidad de los scFOS obtenidos para su uso en la industria

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Ensayo de producción de scFOS a partir de la enzima FTasa comercial

Los scFOS utilizados fueron obtenidos mediante fermentación enzimática utilizando como sustrato una solución de sacarosa de 60 °Brix y como catalizador con actividad FTasa la enzima comercial (A) a una dosis de 1 mL/100 g de solución azucarada. El proceso biosintético tuvo lugar a 50 °C durante 48 h.

2.2 Ensayo de estabilidad frente a altas temperaturas y distinto pH

Las temperaturas ensayadas fueron 100 y 121 °C. Se preparó tampón citrato-fosfato de tres pHs diferentes: 3, 5 y 7 utilizado para solubilizar scFOS hasta alcanzar una concentración del 15 % (w/v). Las soluciones fueron tratadas en estufa (modelo INB 500, Memmert, Alemania) durante 60 min. En este tiempo se fueron tomando muestras a los tiempos 0, 5, 10, 15, 20, 30 y 60 min para su análisis por UPLC con el fin de determinar la concentración de GF₂, GF₃ y GF₄. Todas las condiciones fueron ensayadas por triplicado.

2.3 Ensayo de estabilidad frente a temperatura de almacenamiento y distinto pH

La temperatura ensayada fue 37 °C. Se preparó tampón citrato-fosfato de tres pHs diferentes: 3, 5 y 7, que fueron utilizados para obtener distintas soluciones de scFOS a una concentración de 15 %. Las muestras estuvieron expuestas a 37 °C durante 38 d. Durante este tiempo se fueron tomando muestras en los tiempos 0, 1, 3, 7, 14 y 38 d para su análisis por UPLC con el fin de determinar la concentración de, GF₂, GF₃ y GF₄. Todas las condiciones fueron ensayadas por triplicado.

2.4 Determinación de scFOS mediante cromatografía líquida

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

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Estabilidad de los scFOS a altas temperaturas

3.1.1 *Estabilidad de los scFOS a 100 °C*

Los resultados mostraron que a partir de 30 min de exposición a pH 3 se inicia la hidrólisis de scFOS (Fig. 1A). En las muestras sometidas a pH 5 y pH 7 se observó que el perfil de scFOS se mantuvo casi constante durante los 60 min de tratamiento térmico (Fig. 1B y 1C). Estos datos concuerdan con los obtenidos por Courtin *et al.* (1), que observaron que el tratamiento de 100 °C a una solución de scFOS con pH 2 y 3 da lugar a hidrólisis de los oligosacáridos.

3.1.2 Estabilidad de los scFOS a 121 °C

Cuando el pH de la solución fue 3, los resultados mostraron hidrólisis de los oligosacáridos desde el minuto 5 de tratamiento, siendo GF₂, GF₃ y GF₄ hidrolizados por igual. Cuando el pH de la solución fue 5 y 7, el tratamiento térmico de 121 °C durante 1 h no dio lugar a cambios en la concentración de scFOS (Fig. 2B y 2C). Estos resultados están en consonancia con el trabajo de Courtin *et al.* (1), donde observaron que en una solución a 120 °C ocurre lo mismo que a 100 °C pero más rápido.

3.2 Estabilidad de los scFOS a temperatura de almacenamiento 37 °C

Cuando la solución de pH 3 fue conservada a 37 °C se produjo una hidrólisis de los scFOS desde el inicio del ensayo (Fig. 3A). Por su parte, la solución de scFOS a pH 5 mostró una disminución paulatina de los scFOS a partir del día 7 hasta el final de la conservación (Fig. 3B). Finalmente, a pH 7 y 37 °C se observó una disminución de la concentración de scFOS a partir del día 3-4 de conservación (Fig. 3C). Estos resultados concuerdan con los de Vega y Zúniga-Hansen (9), donde se vió la inestabilidad de los GF₃ a tratamientos térmicos entre 75 y 90 °C cuando están en medios con pH de 3,5.

4. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que las soluciones de scFOS al 15 % sometidas a pH 5 y 7 son estables tras un tratamiento térmico de 1 h a 100 y 121 °C. Sin embargo, en presencia de un pH más ácido (pH 3) tiene lugar la degradación de scFOS tras 20 min de tratamiento. En el caso de conservar a 37 °C, a pH 3 también sucede la hidrólisis de los scFOS pero tras más de 10 días de exposición a esta temperatura. Los scFOS han mostrado ser más resistentes a pH alcalino que ácido.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del Proyecto CDTI (ref. IDI-20141129), llevado a cabo en colaboración con la empresa Zukan S.L., que ha financiado estas investigaciones.

6. REFERENCIAS

1. Mishra S, Mishra HN. Effect of synbiotic interaction of fructooligosaccharide and probiotics on the acidification profile, textural and rheological characteristics of fermented soy milk. *Food Bioprocess Technol.* 2013;6:3166-76.
2. Kumar CG, Sripada S, Poornachandra Y. Status and Future Prospects of Fructooligosaccharides as Nutraceuticals. In *Role of Materials Science in Food Bioengineering.* 2018;451-503.
3. Niness K. Breakfast foods and the health benefits of inulin and oligofructose. *Cereal Foods World.* 1999;44:79-81.
4. Maiorano AE, Piccoli RM, Da Silva ES, de Andrade Rodrigues MF. Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics. *Biotechnol Lett.* 2008;30:1867-77.
5. Roberfroid MB, Delzenne NM. Dietary fructans. *Annu Rev Nutr.* 1998;18:117-43.

- Sánchez O, Guio F, García D, Silva E, Caicedo L. Fructooligosaccharides production by *Aspergillus* sp. N74 in a mechanically agitated airlift reactor. Food Bioprod Process. 2008;86:109-15.
- Vega R, Zúniga-Hansen ME. A new mechanism and kinetic model for the enzymatic synthesis of short-chain fructooligosaccharides from sucrose. Biochem Eng J. 2014;82:158-65.
- Courtin CM, Swennen K, Verjans P, Delcour J A. Heat and pH stability of prebiotic arabinoxyloligosaccharides, xylooligosaccharides and fructooligosaccharides. Food Chem. 2009;112:831-7.
- Vega R, Zuniga-Hansen ME. The effect of processing conditions on the stability of fructooligosaccharides in acidic food products. Food Chem. 2015;173:784-9.

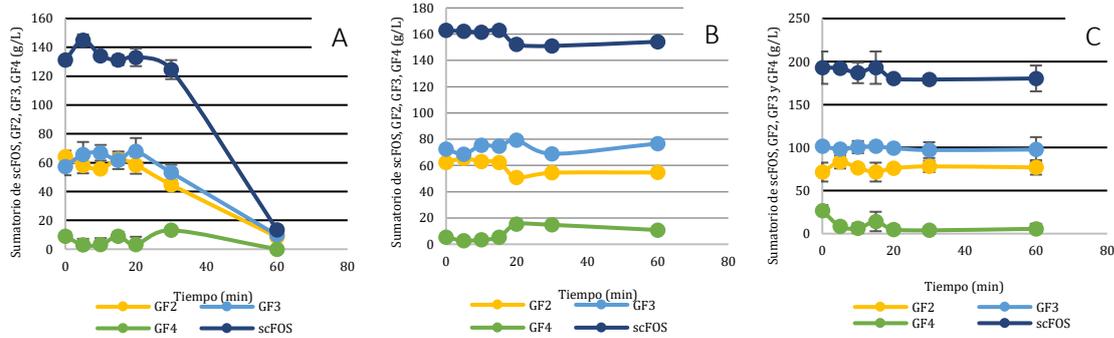


Figura 1. Evolución de la concentración del sumatorio de scFOS, GF₂, GF₃ y GF₄ durante 1 h a 100 °C, de una solución con 15 % de scFOS y pH 3 (A), pH 5 (B) y pH 7 (C).

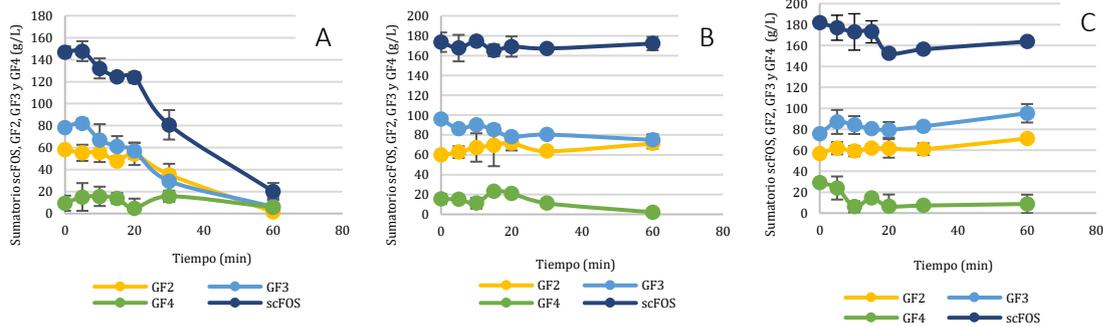


Figura 2. Evolución de la concentración del sumatorio de scFOS, GF₂, GF₃ y GF₄ durante 1 h a 121 °C de una solución con 15 % de scFOS y pH 3 (A), pH 5 (B) y pH 7 (C).

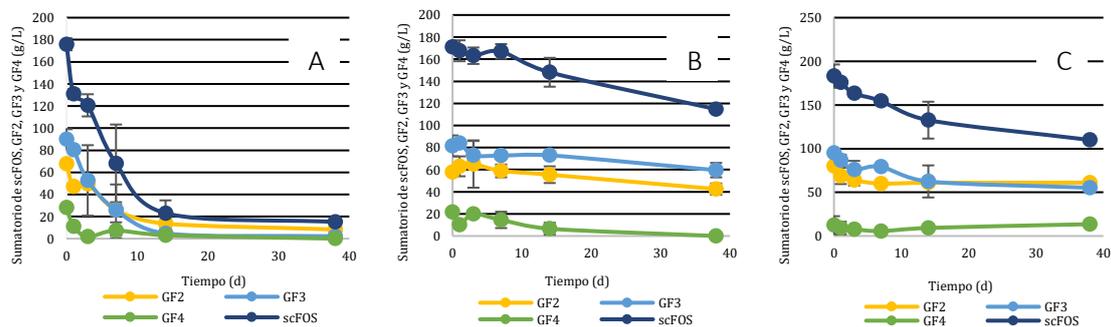


Figura 3. Evolución de la concentración del sumatorio de scFOS, GF₂, GF₃ y GF₄ durante 38 d a 37 °C de una solución con 15 % de scFOS y pH 3 (A), pH 5 (B) y pH 7 (C)

Calafate berry extracts encapsulated by spray-drying and stability assessment

Encapsulados de calafate mediante secado por aspersion y evaluación de su estabilidad

M.E. Romero-Román^{1,3*}, M.D. Lopez¹, C. García-Viguera², P.S. Fernandez³

¹Departamento de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción. Chile.

²Laboratorio de Fitoquímica y Alimentos Saludables, Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, CEBAS-CSIC, Campus Universitario de Espinardo, 25, 30100 Espinardo, Murcia. Spain.

³Departamento de Ingeniería Agronómica, ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena. Spain.

*mariaeugeromero@udec.cl

Abstract

The trend of functional foods consumption has remarked a huge interest for berry-type fruits due to its characteristics as high health-promoting and anti-inflammatory, anti-diabetic, and hypoglycaemic properties. Chile produces several berries and one of them is calafate (*Berberis microphylla* G. Forst). which has a high content of anthocyanins. Several studies have shown the potential of anthocyanins in preventive and curative treatments; however, their use is limited due to low stability under environmental conditions and / or interaction with other compounds. In that sense, the use of techniques such as encapsulation is an option. This work focuses on developing a formulation to get calafate microcapsules by using spray drying technique where 60 % recovery of bioactive compounds was obtained. The evaluation of anthocyanins degradation after storage at room temperature allow to keep the calafate anthocyanins (delphinidin-3-glucoside and petunidine-3-glucoside) stable at 45 % after 4 weeks at room temperature.

Keywords: microencapsulation; bioactive compounds; Chilean berry; degradation analysis.

Resumen

La tendencia del consumo de alimentos funcionales ha puesto de manifiesto el interés por las frutas de tipo baya debido a sus características de alta promoción de la salud propiedades antiinflamatorias, antidiabéticas e hipoglucémicas. Chile produce varias bayas y una de ellas es el calafate (*Berberis microphylla* G. Forst) que posee un alto contenido de antocianinas. Varios estudios han demostrado el potencial de las antocianinas, sin embargo, su uso es limitado debido a la baja estabilidad en condiciones ambientales y/o la interacción con otros compuestos. En ese sentido, el uso de técnicas como la encapsulación es una opción. Este trabajo se centró en el desarrollo de una formulación para obtener microcápsulas de calafate mediante la técnica de secado por aspersion donde se obtuvo un 60 % de recuperación de compuestos bioactivos y tras la evaluación de la degradación de las antocianinas después del almacenamiento a temperatura ambiente se logró mantener estables en un 45 % las antocianinas mayoritarias (delphinidina-3-glucósido y petunidina-3-glucósido) de calafate durante 4 semanas.

Palabras clave: microencapsulación; compuestos bioactivos; baya chilena; análisis de degradación.

1. INTRODUCCIÓN

El calafate, *Berberis microphylla* G. Forst, es una baya rica en antocianinas, cuya distribución geográfica está determinada entre la Patagonia argentina y chilena. Es un arbusto que produce bayas con características y composición bioquímica similar a otras especies similares (1) pero con escasa o nula industrialización (2). Aunque los frutos y raíces de calafate han sido utilizadas por pueblos originarios para la alimentación y preparación de medicinas ancestrales, existe poca información, y a la vez pocos productos disponibles en el mercado en base a este fruto rico en antioxidantes.

Los frutos de calafate producen 18 antocianinas glucosiladas de delphinidina, petunidina, malvidina, peonidina y cianidina (3,4); sin embargo, estos compuestos son susceptibles de degradación cuando se exponen al calor, oxígeno y cambios de pH (5). La tecnología de encapsulación es una estrategia útil para proteger las antocianinas y evitar su degradación. El secado por aspersión (SD) es una de las técnicas más comunes utilizadas para encapsular antocianinas (6) en la industria alimentaria.

La encapsulación de antocianinas permite proteger estos compuestos del ambiente, extender su vida útil y ofrece la posibilidad de desarrollar nuevos alimentos funcionales con antocianinas más estables y efectivos dentro de la matriz (7), no obstante, dicha estabilidad debe ser evaluada bajo diferentes condiciones de almacenamiento. Este trabajo tuvo como objetivo estudiar y desarrollar microencapsulados a partir de extractos de frutos de calafate utilizando la técnica de secado por aspersión y evaluar su estabilidad en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente con el fin de proteger estos compuestos con potencial para fines de nutrición y salud.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materia prima y extracción

Los frutos de calafate (*Berberis microphylla* G. Forst) fueron colectados en la región de Aysén (sur de Chile) y se mantuvieron a -80 °C antes de los ensayos. La extracción polifenólica inicial se llevó a cabo utilizando agua: metanol: ácido fórmico (24:25:1), sonicación durante 1 h y 24 h de maceración a temperatura ambiente, una sonicación posterior de 1 h y filtración antes del análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

2.2 Secado por aspersión

Para la encapsulación de los extractos de calafate se utilizaron 3 dosis de maltodextrina (MD) (10, 20 y 30 %) Previo a la encapsulación los extractos de calafate (100 g) se mezclaron con etanol en proporción 1:6 y se agitaron durante 24 h, y se extrajo usando una bomba de vacío. La MD (según las dosis indicadas anteriormente), se preparó en agua destilada y se mantuvo en agitación constante durante 12 h, después, se añadió el extracto de calafate en proporción 1:1. El resultante se homogeneizó mientras ingresaba al mini secador B-290 (Buchi, Flawil, Suiza). El equipo se operó con temperatura del aire de entrada 120±2 °C (determinada en pruebas anteriores) con velocidad de alimentación y flujo de aire constantes (1 mL/min y 600 L/h respectivamente). Una vez definida la mejor dosis para proteger los compuestos de calafate, se realizó un ensayo para determinar la degradación de las antocianinas a temperatura ambiente durante 4 semanas.

2.3 Identificación y cuantificación de antocianinas

La determinación de las antocianinas de encapsulados de calafate (incluido el extracto control) se realizó por HPLC-DAD (HPLC Merck-Hitachi, Darmstadt, Alemania). La evaluación de la degradación se realizó mediante la comparación entre las antocianinas presentes en los

encapsulados a 1, 2, 7, 14, 21 y 28 d y lo reportado para el control previo a la encapsulación. Se usó malvidina 3-galactósido como estándar a 520 nm. Se realizaron 3 réplicas de cada muestra para posteriormente comparar los tratamientos mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel significativo de $p \leq 0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cantidad de antocianinas mostró diferencias significativas (Tabla 1) entre los tratamientos de variación del porcentaje de Maltodextrina-MD utilizada que además se refleja en el rendimiento y la recuperación de polvos encapsulados en estos ensayos.

El porcentaje de recuperación después del tratamiento de secado por aspersión fue del 60 ± 3 %, lo que demuestra que el tratamiento fue eficiente. No obstante, se podría aún mejorar tal como se reporta en trabajos similares realizados con otra baya chilena (8). A pesar de que se conoce que el calafate posee 18 derivados de antocianidinas, después del proceso de encapsulación solo se evaluaron ocho de estas antocianinas. Se puede deducir que las antocianinas minoritarias se perdieron durante el tratamiento de extracción y/o secado por aspersión concordando con otros autores que atribuyen la disminución de polifenoles y antocianinas a la degradación / conversión debido a las altas temperaturas de entrada generadas en el proceso de secado por pulverización (9).

Considerando que la encapsulación mediante secado por pulverización es una tecnología de inmovilización, podemos afirmar que algunos compuestos probablemente quedan expuestos en la superficie de las micropartículas producto del proceso de secado, lo que provocaría la degradación de las mismas al contacto con el ambiente (6). No obstante, los porcentajes de delphinidina-3-glucósido y petunidina-3-glucósido (antocianinas mayoritarias en los encapsulados de calafate) se mantuvieron sobre el 45 % al final de la evaluación (4 semanas), lo que no sucedió con las malvidina que se mantuvieron casi constantes desde el día cero hasta el final del ensayo (Fig. 1).

4. CONCLUSIONES

El encapsulado mediante secado por aspersión es efectivo para conferir estabilidad a las antocianinas obtenidos a partir de extractos de calafate. No obstante, se necesitan ensayos adicionales para mejorar y optimizar estos resultados.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido apoyado por FONDECYT proyecto 1160899 (CONICYT, Chile) y SENESCYT, Ecuador quien financia la beca de ME. Romero-Román. La Doctoranda hace un reconocimiento especial a M^a Dolores López, Directora de Posgrado de Agronomía de la Universidad de Concepción (UdeC), Chile, por la gestión para la firma del Convenio ETSIA-UPCT con la UdeC que permite la realización de la Tesis Doctoral bajo el régimen de cotutela.

6. REFERENCIAS

1. Boeing JS, Barizão ÉO, e Silva BC, Montanher PF, de Cinque Almeida V, Visentainer JV. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. Chem Cent J [Internet]. 2014 Aug 22 [cited 2017 Jul 2];8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4158270/>
2. Lopez MD, Romero ME, Vera B. El calafate. Su industrialización abre nuevas perspectivas. Indualimentos [Internet]. 2018 abril;110. Available from: <http://www.indualimentos.cl/edic.html>

3. Ruiz A, Hermosín-Gutiérrez I, Mardones C, Vergara C, Herlitz E, Vega M, et al. Polyphenols and Antioxidant Activity of Calafate (*Berberis microphylla*) Fruits and Other Native Berries from Southern Chile. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2010 May 26 [cited 2018 May 28];58(10):6081–9. Available from: <https://doi.org/10.1021/jf100173x>
4. Romero Román M, Noriega Vásquez F, Farías Villagra M, Belchi L, Jara Zapata P, Vera Flores B. Nuevas fuentes de antioxidantes naturales: caracterización de compuestos bioactivos en cinco frutos nativos de Chile. 2019;
5. Mahdavi SA, Jafari SM, Ghorbani M, Assadpoor E. Spray-drying microencapsulation of anthocyanins by natural biopolymers: A review. *Drying technology*. 2014;32(5):509–18.
6. Robert P, Fredes C. The Encapsulation of Anthocyanins from Berry-Type Fruits. *Trends in Foods. Molecules* [Internet]. 2015 Apr 3 [cited 2018 Apr 24];20(4):5875–88. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/20/4/5875>
7. Rodríguez R, Rojas G, Rodríguez S. Encapsulation of probiotics for food applications. *Biosalud* [Internet]. 2016 Dec [cited 2018 Apr 24];15(2):106–15. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1657-95502016000200009&lng=en&nrm=iso&tlng=es
8. Fredes C, Becerra C, Parada J, Robert P. The Microencapsulation of Maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz) Juice by Spray-Drying and Freeze-Drying Produces Powders with Similar Anthocyanin Stability and Bioaccessibility. *Molecules* [Internet]. 2018 May 20 [cited 2018 May 28];23(5):1227. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/5/1227>
9. Rezende YRRS, Nogueira JP, Narain N. Microencapsulation of extracts of bioactive compounds obtained from acerola (*Malpighia emarginata* DC) pulp and residue by spray and freeze drying: Chemical, morphological and chemometric characterization. *Food Chemistry* [Internet]. 2018 Jul 15 [cited 2018 May 28];254:281–91. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814618302516>

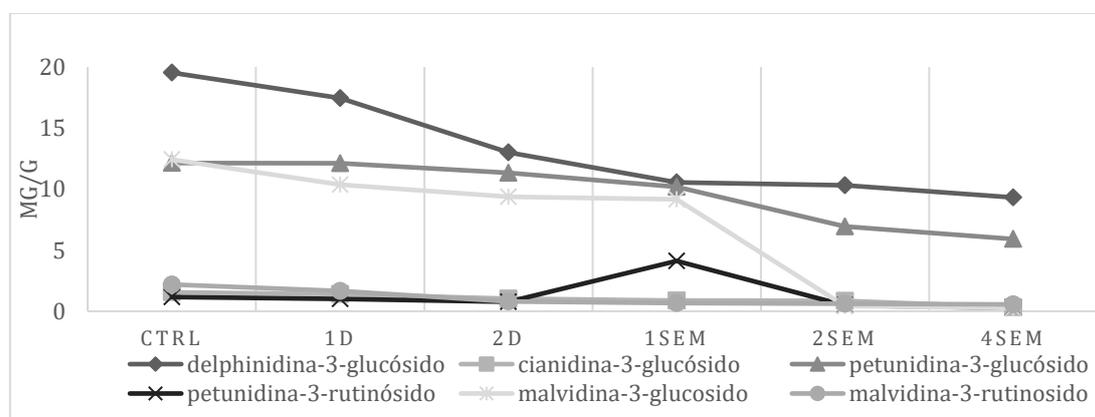


Figura 1. Degradación de antocianinas a partir de encapsulados de calafate mediante secado por aspersion a lo largo de 4 semanas a temperatura ambiente y expresados en mg/g. CTRL: control; D: día; SEM: semana.

Tabla 1. Antocianinas, rendimiento y recuperación de encapsulados de calafate mediante secado por aspersion con diferentes dosis de maltodextrina.

%MD	AT	Rendimiento	Recuperación
15-120	176,5±4 ab	38,9 b	59,3 b
20-120	184±12 a	36,1 b	60,1 b
30-120	172,8±2 ab	31,8 a	58,0 a
Control (extract)	301,24±3 b	-	-

% MD (porcentaje de maltodextrina); AT (antocianinas totales) expresado en mg cianidina / 100 g de muestra. Diferentes letras entre columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

ORAL SESSION II:
Plant Production
Technology and
Engineering and Agro-
food Economy

Circadian rhythms of plant water indicators in citrus

Ritmos circadianos de indicadores hídricos de planta en cítricos

A.B. Mira-García^{1*}, W. Conejero¹, J. Vera¹, M.C. Ruiz-Sánchez¹, C. Romero-Trigueros^{1,2}, J.M. Bayona¹, P.A. Nortés¹, J.J. Alarcón¹, E. Nicolás¹

¹Departamento de Riego, CEBAS-CSIC, Campus Universitario de Espinardo, 30100 Murcia. Spain.

²Department of Agricultural & Environmental Sciences, Universidad degli Studi di Bari, Vía Amendola 165A, Bari. Italy.

*abmira@cebas.csic.es

Abstract

The main objective of the work was to evaluate the diurnal courses of plant water status indicators for precision irrigation of: (I) young lime trees (*Citrus latifolia* Tan., cv. Bearss) grown under two growing conditions: open air and shade net, and (II) adult grapefruit trees (*Citrus paradisi* Macf., cv. Star Ruby) irrigated with two different quality water: Tagus-Segura transfer water (EC \approx 1 dS/m) and regenerated saline water (EC \approx 3.5 dS/m). Plant water status indicators showed circadian rhythms in all the studied conditions. Lime plants cultivated under shading net presented higher stomatal conductance and net photosynthesis than plants cultivated in the open air. Slight differences were found in stem water potential and canopy temperature between both cropping conditions. Grapefruit plants irrigated with regenerated saline water showed lower values of gas exchange and stem water potential, and a higher canopy temperature. In conclusion, the shading conditions significantly affected the stem water potential and gas exchange, favouring the absorption of CO₂. Plants irrigated with saline regenerated water showed a worse water status as a result of the high concentration of salts in the soil, which made water absorption by the plant difficult.

Keywords: canopy temperature; leaf water relations; lime trees; grapefruit trees.

Resumen

El objetivo del trabajo fue evaluar los ritmos diarios de indicadores del estado hídrico de la planta, para la programación del riego de: (I) limeros (*Citrus latifolia* Tan., cv. Bearss) jóvenes cultivados al aire libre y bajo malla de sombreo, y (II) pomelos (*Citrus paradisi* Macf., cv. Star Ruby) adultos regados con agua de diferente calidad: agua del trasvase (CE \approx 1 dS/m) y agua salina regenerada (CE \approx 3,5 dS/m). Los indicadores mostraron un ritmo circadiano similar en todas las condiciones ensayadas. Los limeros cultivados bajo malla de sombreo presentaron una mayor conductancia estomática y fotosíntesis neta que los cultivados al aire libre. El potencial hídrico de tallo y la temperatura de copa fueron similares en ambas condiciones. Los pomelos regados con agua salina regenerada mostraron valores más bajos de intercambio gaseoso y potencial hídrico de tallo, y una temperatura de copa mayor. En conclusión, las condiciones de sombreo afectaron de forma significativa al intercambio gaseoso, favoreciendo la absorción de CO₂. Las plantas regadas con agua regenerada salina mostraron un peor estado hídrico, resultado de que la alta concentración de sales presente en el suelo dificultó la absorción de agua por la planta.

Palabras clave: temperatura de la copa; relaciones hídricas en hoja; limeros; pomelos.

1. INTRODUCCIÓN

España es el productor de cítricos más importante de la unión europea (6.882,0 Mt) y el primer exportador en el mundo (4,1 Mt) (1). En la Región de Murcia las especies cítricas cultivadas tradicionalmente son: limón (555.760 t), naranja (137.345 t) y mandarina (123.800 t). La producción en la región de otras especies cítricas como la lima y el pomelo, aunque es minoritaria (530 y 28.762 t, respectivamente) (2), permite diversificar y ampliar la oferta cítrica nacional e internacional.

En los próximos años, como consecuencia del cambio climático, se prevé un aumento de la limitación de recursos hídricos. El uso de indicadores fisiológicos del estado hídrico en la programación del riego junto a la aplicación de estrategias de riego deficitario controlado (RDC) permite aumentar la eficiencia de uso del agua. Estos indicadores permiten conocer el estado hídrico de la planta a través de las variaciones de ciertos parámetros fisiológicos como: potencial hídrico (Ψ), intercambio gaseoso (conductancia estomática, g_s y fotosíntesis neta, F_n) o las fluctuaciones del diámetro del tronco (FDT) entre otros, pudiendo en base a ello ajustar la dosis del riego. El uso de la temperatura de la cubierta vegetal (T_c) como indicador de estado hídrico está en auge en los últimos años resultado del desarrollo de la termografía de infrarrojos. Previo al uso de estos indicadores en la programación del riego se hace necesario evaluar su capacidad para detectar en situaciones de estrés hídrico. Por ello, el objetivo del trabajo es evaluar las variaciones diarias de diferentes indicadores de estado hídrico en: (I) limeros jóvenes cultivados al aire libre y bajo malla de sombreo, y (II) pomelos adultos regados con agua de diferente calidad: del trasvase y salina regenerada.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se realizó en una parcela de 1,2 ha de limeros jóvenes (*Citrus latifolia* Tan., cv. Bearss) en la finca experimental del CEBAS, en Santomera (Murcia), y en una parcela de 1 ha de pomelos adultos (*Citrus paradisi* Macf., cv. Star Ruby), en la finca comercial "Lo Montero" en Molina de Segura (Murcia). Las limas estaban plantadas en mesetas a un marco de 6 m x 5 m y los pomelos sin meseta a un marco de 6 m x 4 m. Ambos cultivos estaban injertados sobre *Citrus macrophylla* L. y el sistema de riego localizado consistió en un doble lateral de riego en limeros y un simple lateral de riego en pomelos con 4 goteros de 4 L h⁻¹ por árbol. En limeros el riego fue automatizado (3) hasta completar sus necesidades hídricas, y se evaluaron 2 condiciones de cultivo: aire libre y bajo malla (coeficiente de sombreo del 24 %) en parcelas de 60 árboles cada una. En pomelos se establecieron 2 tratamientos de riego, ambos regados al 100 % ET_c (ET_c=ET₀*K_c, ET₀ de la ecuación de Penman-Monteith (4) y K_c (5)), con dos fuentes de agua: agua del trasvase Tajo-Segura (AT) conductividad eléctrica (CE≈1 dS m⁻¹) y agua regenerada salina (AR) procedente de la estación depuradora de aguas residuales (EDAR) de Molina de Segura (CE≈3,5 dS m⁻¹).

En dos días típicos de verano de 2018 se realizaron medidas discretas (cada 1-2 h) del potencial hídrico de tallo (Ψ_{tallo}) y del intercambio gaseoso foliar (fotosíntesis neta (F_n) y conductancia estomática (g_s)). El Ψ_{tallo} se midió con una cámara de presión en hojas maduras localizadas en la cara sombreada del árbol, las cuales fueron tapadas al menos dos horas antes de la medida (6). El intercambio gaseoso se determinó con un medidor portátil de fotosíntesis en hojas maduras situadas en la cara soleada del árbol. También se midió de forma continua la temperatura de la copa (T_c) con termo-radiómetros de infrarrojos instalados a una distancia de ≈0,5 m sobre la copa. Las medidas se realizaron en 4 árboles por condición de cultivo o tratamiento de riego. A partir de la medida de T_c se calculó la diferencia entre la temperatura de la copa y la del aire (T_c-T_a). Las condiciones meteorológicas fueron registradas por unas estaciones climáticas situadas en las propias fincas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el cultivo del limero se observó que Ψ_{tallo} fue similar en ambas condiciones de cultivo durante la mañana, mientras que por la tarde fue ligeramente diferente, mostrando las plantas cultivadas bajo malla de sombreo valores más negativos de Ψ_{tallo} que las plantas cultivadas al aire libre (Fig. 1B). Esto se debe a que Ψ_{tallo} es muy dependiente de la demanda evaporativa atmosférica y en ese momento del día el déficit de presión de vapor (DPV) fue mayor en condiciones de sombreo (Fig. 1A). García-Orellana et al. (7) también observaron una alta correlación entre Ψ_{tallo} y DPV. En cambio, el intercambio gaseoso fue significativamente diferente, mostrando las plantas cultivadas bajo malla de sombreo un 54 % más de g_s acumulada diaria (Fig. 1C). Los valores medios diarios de F_n también fueron mayores (37 %) en las plantas cultivadas bajo malla de sombreo (Fig. 1E). Este aumento en el intercambio gaseoso podría ser debido a que las plantas estaban expuestas a una menor radiación PAR (Fig. 1A) y estas condiciones no saturantes de PAR ($<1.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante todo el día) permitieron que los estomas permanecieran abiertos por más tiempo (Fig. 1C), favoreciendo la absorción de CO_2 . La temperatura de la copa fue similar en ambas condiciones de cultivo a lo largo del día, excepto a mediodía solar cuando T_c fue $2,7 \text{ }^\circ\text{C}$ mayor en las plantas cultivadas bajo malla de sombreo (Fig. 1D). Blakey et al. (8) observaron un incremento del 10 % en la máxima T_c en aguacate en condiciones de sombreo. Sin embargo, la diferencia de temperatura entre la copa y el aire ($T_c - T_a$) fue menor en las plantas cultivadas en condiciones de sombreo (Fig. 1F). Estos valores más bajos de $T_c - T_a$ están relacionados con un mayor grado de refrigeración de la hoja, debido al incremento de g_s en las plantas cultivadas bajo malla de sombreo (Fig. 1C).

En el cultivo del pomelo, Ψ_{tallo} fluctuó entre $-0,5$ y $-1,5$ MPa, con valores más negativos en las plantas regadas con agua salina regenerada (Fig. 2B), consecuencia de la elevada concentración de sales en el suelo, que dificultó la absorción de agua por la planta (9), repercutiendo negativamente en su estado hídrico. El ciclo diario de g_s y F_n fue similar en ambos tratamientos, con valores máximos al inicio y final del día y mínimos a mediodía solar, oscilando g_s entre 20 y $75 \text{ mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y F_n entre 2 y $8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En las plantas regadas con AR, g_s también fue menor (Fig. 2C), lo que podría disminuir la absorción de CO_2 y consecuentemente la fotosíntesis, que se redujo a mediodía solar a niveles muy bajos ($2,62 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Fig. 2E). Una reducción, aunque no significativa, del intercambio gaseoso (g_s y F_n) se ha encontrado en mandarinos regados con AR (10). La reducción del intercambio gaseoso en las plantas regadas con AR favoreció el aumento de T_c , especialmente a mediodía solar cuando fue $2,2 \text{ }^\circ\text{C}$ mayor en las plantas regadas con AR (Fig. 2D), mostrando una mayor diferencia de temperatura entre la copa y el aire ($T_c - T_a$) a lo largo de todo el día, con una diferencia máxima diaria de $0,95 \text{ }^\circ\text{C}$.

4. CONCLUSIONES

Los indicadores de estado hídrico resultaron afectados por las condiciones de cultivo y por la calidad del agua de riego. Las condiciones de sombreo afectaron de forma significativa al intercambio gaseoso y la temperatura de la copa, favoreciendo la absorción de CO_2 en limeros. Los pomelos regados con agua regenerada salina mostraron un peor estado hídrico (potencial hídrico, intercambio gaseoso y temperatura de copa) resultado de que la alta concentración de sales presente en el suelo dificultó la absorción de agua por la planta. El registro continuo y automático de la temperatura de la copa, convierte este indicador en una prometedora herramienta para la programación del riego de precisión en cítricos.

5. AGRADECIMIENTOS

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

6. REFERENCIAS

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Citrus Fruit: fresh and processed. Statistical Bulletin 2017 [Internet]. 2017. Available from: <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/citricos/es>
2. Centro Regional de Estadística de Murcia (CREM). Estadísticas Agricultura, Ganadería, Selvicultura y Pesca. Evolución de la producción agrícola según tipo de cultivo. 2018 [Internet]. 2018. Available from: <http://econet.carm.es/web/crem/inicio/-/crem/sicrem/PU590/sec23.html>
3. Vera J, Conejero W, Conesa MR, Ruiz-Sánchez MC. Irrigation factor approach based on soil water content: a nectarine orchard case study. *Water*. 2019;11(3):589.
4. Allen RG, Pereira LS, Raes D, Smith M, Ab W. Crop evapotranspiration: Guidelines for computing crop water requirements [Internet]. Irrigation and Drainage Paper No. 56, FAO. Rome; 1998. 300 p.
5. Pedrero F, Maestre-Valero JF, Mounzer O, Nortes PA, Alcobendas R, Romero-Trigueros C, et al. Response of young 'Star Ruby' grapefruit trees to regulated deficit irrigation with saline reclaimed water. *Agric Water Manage*. 2015;158:51-60.
6. Hsiao TC. Measurements of plant water status. In: Eds. B A Stewart and D R Nielsen, editor. *Irrigation of Agricultural Crops (Monograph no 30)*. Madison: American Society of Agronomy. 1990. p. 243-79.
7. García-Orellana Y, Ortuño MF, Conejero W, Ruiz-Sánchez MC. Diurnal variations in water relations of deficit irrigated lemon trees during fruit growth period. *Spanish J Agric Res*. 2013;11(1):137-45.
8. Blakey, R.J., van Rooyen, Z., Köhne, J.S., Malapana, K.C., Mazhawu, E., Tesfay, S.Z., Savage MJ. Growing avocados under shade netting. Progress Report-Year 2. Grow Assos Year B. 2016;38:80-3.
9. Mounzer O, Pedrero-Salcedo F, Nortes PA, Bayona JM, Nicolás-Nicolás E, Alarcón JJ. Transient soil salinity under the combined effect of reclaimed water and regulated deficit drip irrigation of mandarin trees. *Agric Water Manage*. 2013;120(1):23-9.
10. Nicolás E, Alarcón J, Mounzer O, Pedrero F, Nortes P, Alcobendas R. Long-term physiological and agronomic responses of mandarin trees to irrigation with saline reclaimed water. *Agric Water Manage*. 2016;166:1-8.

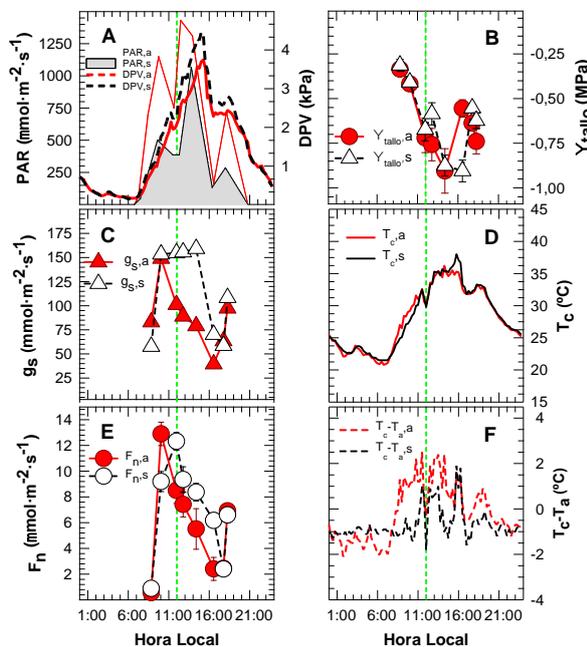


Figura 1. Evolución diaria de: radiación PAR y déficit de presión de vapor (DPV) (A), potencial hídrico de tallo (Ψ_{tallo}) (B), conductancia estomática (g_s) (C), temperatura de la copa (T_c) (D) fotosíntesis neta (F_n) (E) y diferencia de temperatura entre la copa y el aire (T_c-T_a) (F) en limeros jóvenes cultivados al aire libre (a) y bajo malla de sombreo (s). Agosto 2018.

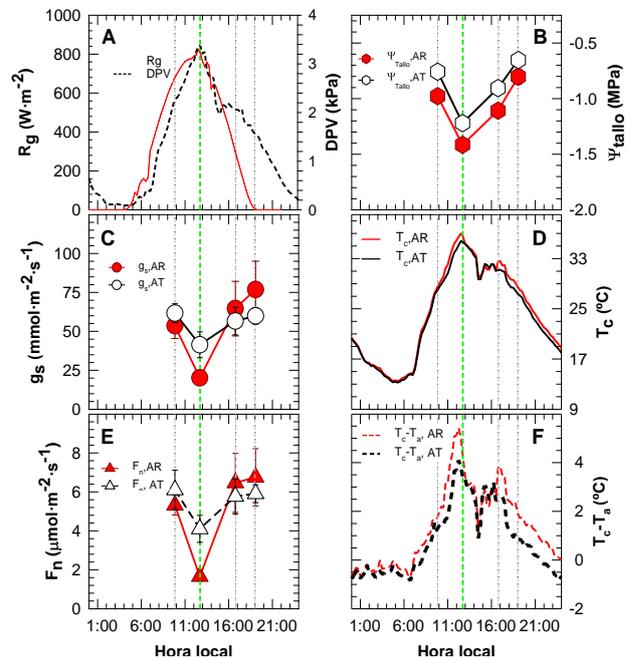


Figura 2. Evolución diaria de: radiación global (R_g), déficit de presión de vapor (DPV) (A), potencial hídrico de tallo (Ψ_{tallo}) (B), conductancia estomática (g_s) (C), temperatura de la copa (T_c) (D) fotosíntesis neta (F_n) (E) y diferencia de temperatura entre la copa y el aire (T_c-T_a) (F) en pomelos adultos regados con agua del trasvase (AT) y regenerada salina (AR). Agosto 2018.

Effect of the use of nitrification inhibitors on the growth and production of 'Iceberg' lettuce

Efecto del uso de inhibidores de la nitrificación sobre el crecimiento y producción de lechuga 'Iceberg'

P. Berríos*, A. Pérez-Pastor

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

*pablo.berrios@edu.upct.es

Abstract

The use of nitrification inhibitors (NI) increases the sustainability of nitrogen fertilization since they can reduce leaching of nitrogen as nitrate. There is no consensus on the effect of NI incorporation on crop yield given the sensitivity of some crops to ammonium, such as lettuce. A lettuce crop was grown during autumn-winter in Cartagena (Murcia) to determine the effect of the incorporation of DMPP and DCD in lettuce fertirrigation on the growth and yield. No differences were detected regarding control or between the NI used on growth during the crop cycle, yield or suitability for agro-industry.

Keywords: DMPP; DCD; ammonium sulfate; fertirrigation.

Resumen

El uso de inhibidores de la nitrificación (IN) permite incrementar la sostenibilidad de la fertilización nitrogenada puesto que pueden reducir la lixiviación de nitrógeno en forma de nitrato. No existe consenso sobre el efecto de la incorporación de IN sobre el rendimiento de los cultivos dada la sensibilidad de algunos al amonio, tal es el caso de lechuga. Se realizó un cultivo de lechuga durante otoño-invierno en Cartagena (Murcia) para determinar el efecto de la incorporación de DMPP y DCD en la fertirrigación de lechuga sobre el crecimiento y rendimiento del cultivo. No se detectaron diferencias respecto al control ni entre los IN utilizados sobre el crecimiento durante el ciclo de cultivo, la producción ni la aptitud para la agroindustria.

Palabras clave: DMPP; DCD; sulfato de amonio; fertirriego.

1. INTRODUCTION

Los inhibidores de la nitrificación (IN) retardan la oxidación de amonio en la solución del suelo y por lo tanto se puede reducir la lixiviación de N como nitrato (1). Actualmente, los IN disponibles para fertilización mineral son la diciandiamida + 1H-1,2,4-triazol (DCD-TZ) y 3,4-dimetilpirazol fosfato (DMPP) y para fertilizantes orgánicos líquidos el 1H-1,2,4-triazol y 3-metilpirazol (TZ-MP) (2-4). Si bien el uso de IN permite incrementar la sostenibilidad de la fertilización nitrogenada, se ha reportado una reducción de la biomasa en lechugas abonadas con N amoniacal, dada la sensibilidad de algunos cultivos al amonio (5) y existen resultados variados sobre el efecto de los IN sobre el rendimiento. Tal es el caso, que en condiciones edafoclimáticas europeas la adición de DMPP permitió incrementar el rendimiento de granos, tubérculos y hortalizas (6,7), pero en la producción de patata bajo riego sobre suelos arenosos e hipertermales no se recomienda utilizar IN (8).

El objetivo de este estudio es determinar el efecto de la incorporación de IN en la fertirrigación de lechuga sobre el crecimiento y rendimiento del cultivo en las condiciones edafoclimáticas del Campo de Cartagena.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se estableció un cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) tipo 'Iceberg' sobre un suelo franco limoso el 25 de noviembre de 2019 en Cartagena (Región de Murcia) a una densidad de plantación de 7,4 plantas por m². El cultivo fue regado por un sistema de goteo con una lateral por caballón y emisores distanciados a 0,2 m con un caudal de 0,8 L h⁻¹. Se establecieron 3 tratamientos de fertirrigación mediante la incorporación de IN (bajo dos formatos, DMPP y DCD) con 3 repeticiones distribuidas al azar en una parcela de 800 m². En cada tratamiento se aplicaron 76,26 kg N ha⁻¹ que correspondieron al 100 % del requerimiento de N para un rendimiento esperado de 35,5 t ha⁻¹ (BORM N°104) (9). Los tratamientos aplicados correspondieron a i) CTL: Sulfato de amonio; ii) Sulfato de amonio + DMPP y iii) Sulfato de amonio + DCD.

Se realizó un seguimiento a la evolución de la biomasa seca correspondientes a hojas externas e internas procedentes de 5 plantas por repetición secadas en estufa a 60 °C hasta obtener peso constante y al índice de área foliar (IAF), mediante un medidor de área foliar LI-3100C (LI-COR Biosciences, EE. UU.). Para el rendimiento se determinó la biomasa aérea total, hojas de descarte y peso comercial obtenidas a recolección. El rendimiento final (T ha⁻¹) se calculó con un índice de cosecha de 0,8. Además, se caracterizó la biomasa comercial determinando el área de sección transversal del tallo, diámetro y alto a 10 plantas por repetición. Se determinó el índice de calidad "D" que señala la aptitud comercial de lechugas para procesado como producto de cuarta gama según la fórmula: $D = \text{Peso fresco [g]} / (\text{Diámetro [cm]} \cdot 10)$.

Los datos se analizaron mediante un ANDEVA ($p > 0,05$) con el software estadístico *InfoStat* (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ciclo de cultivo tuvo una duración de 98 d desde trasplante a recolección y la evapotranspiración de referencia media y acumulada correspondió a 1,37 mm d⁻¹ y 1335,6 m³ ha⁻¹, respectivamente. El volumen total de riego aplicado fue de 837,8 m³ ha⁻¹ y no existió efecto de los tratamientos sobre la fecha de recolección.

La evolución de la materia seca e IAF fue similar para todos los tratamientos y no se detectaron diferencias significativas para ningún momento evaluado durante el ciclo de cultivo. La materia seca final de hojas obtenida correspondió a de 57,18±4,1 g por planta y el IAF fue de 7,95±0,58. La mayor tasa de crecimiento del cultivo se observó a partir de 49 d después del trasplante (DDT), previo a este período sólo se había alcanzado el 7,4 y 7,2 % de la materia seca total e IAF final. La tasa de acumulación de materia seca para el período previo a 49 DDT correspondió a 0,12 g d⁻¹, a diferencia de 49-80 y 80-98 DDT donde se acumularon 0,76 y 1,61 g d⁻¹, respectivamente (Fig. 1). Es importante considerar esta dinámica de crecimiento observada puesto que permite planificar de mejor manera la distribución del aporte de N durante el cultivo para evitar una acumulación en el perfil del suelo y ser susceptible a lixiviación ocasionada por precipitaciones, sobre todo en un cultivo de otoño-invierno.

No se detectaron diferencias entre tratamientos respecto de la biomasa fresca aérea total, descarte en finca (hojas exteriores) y peso comercial (hojas interiores). El mayor rendimiento observado procedente de valores más elevados de ASTT, diámetro y alto de las lechugas se correspondió con el tratamiento DMPP, aunque las diferencias encontradas no fueron significativas en la producción (Fig. 2) ni en los parámetros evaluados en la Tabla 1. No existió

efecto de los tratamientos sobre el índice D y todas las lechugas producidas tenían aptitud para procesamiento de cuarta gama puesto que en todos los casos el índice fue inferior a 5 (Tabla 1).

4. CONCLUSIONES

La incorporación de inhibidores de nitrificación en la producción de lechuga 'Iceberg' en el Campo de Cartagena no afectó el crecimiento durante el ciclo de cultivo, la producción ni la aptitud para la agroindustria.

No se detectaron diferencias entre DMPP y DCD sobre el crecimiento y rendimiento, pero los resultados obtenidos deben complementarse con la evaluación de su efecto sobre la reducción de la lixiviación de nitratos para determinar la idoneidad de éstos.

5. AGRADECIMIENTOS

Estos resultados se enmarcan en el proyecto "Nuevas técnicas para mejorar la eficiencia de la fertirrigación mediante el uso de IN en cultivos hortícolas de la Región de Murcia" ejecutado por el Grupo Operativo de Nutrición Vegetal Sostenible: NUVES y financiado por el Programa de Desarrollo Rural de la Región de Murcia y con participación del Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural y el Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente del Gobierno de España. Asimismo, se agradece a los socios participantes y colaboradores integrantes del GO-NUVES.

6. REFERENCIAS

1. Barth G, Von Tucher S, Schmidhalter U. Influence of soil parameters on the effect of 3,4-dimethylpyrazole-phosphate as a nitrification inhibitor. *Biol Fertil Soils*. 2001;34(2):98-102.
2. Trenkel ME. Slow-and Controlled-Release and Stabilized Fertilizers: An Option for Enhancing Nutrient Use Efficiency in Agriculture [Internet]. 2010 [cited 2019 Apr 18]. Available from: www.fertilizer.org
3. Goring CAI. Control of nitrification by 2-chloro-6-(trichloro-methyl) pyridine. *Soil Sci*. 1962;93(3):211-8. <https://insights.ovid.com/crossref?an=00010694-196203000-00010>
4. Zerulla W, Barth T, Dressel J, Erhardt K, Horchler von Locquenghien K, Pasda G, et al. 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) - a new nitrification inhibitor for agriculture and horticulture. *Biol Fertil Soils*. 2001;34(2):79-84. <http://link.springer.com/10.1007/s003740100380>
5. Cruz C, Bio AFM, Domínguez-Valdivia MD, Aparicio-Tejo PM, Lamsfus C, Martins-Loução MA. How does glutamine synthetase activity determine plant tolerance to ammonium? *Planta*. 2006;223(5):1068-80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16292661>
6. Pasda G, Hähndel R, Zerulla W. Effect of fertilizers with the new nitrification inhibitor DMPP (3,4-dimethylpyrazole phosphate) on yield and quality of agricultural and horticultural crops. *Biol Fertil Soils*. 2001;34(2):85-97. <http://link.springer.com/10.1007/s003740100381>
7. Wozniak H, Michel H, Fuchs M. Nitrification inhibitors for economically efficient and environmental friendly nitrogen fertilization. In: IFA, editor. *Proceedings of IFA Agricultural Conference on Managing Plant Nutrition*. Barcelona: International Fertilizer Industry Association (IFA); 1999;182-94.
8. Martin HW, Graetz DA, Locascio SJ, Hensel DR. Nitrification Inhibitor Influences on Potato. *Agron J*. 1993;85(3):651-5. <https://www.agronomy.org/publications/aj/abstracts/85/3/AJ0850030651>
9. Consejería de Agua Agricultura y Medio Ambiente. *Boletín Oficial de la Región de Murcia* N°140. Murcia, España: Región de Murcia; Jun 18, 2016;19504-27.

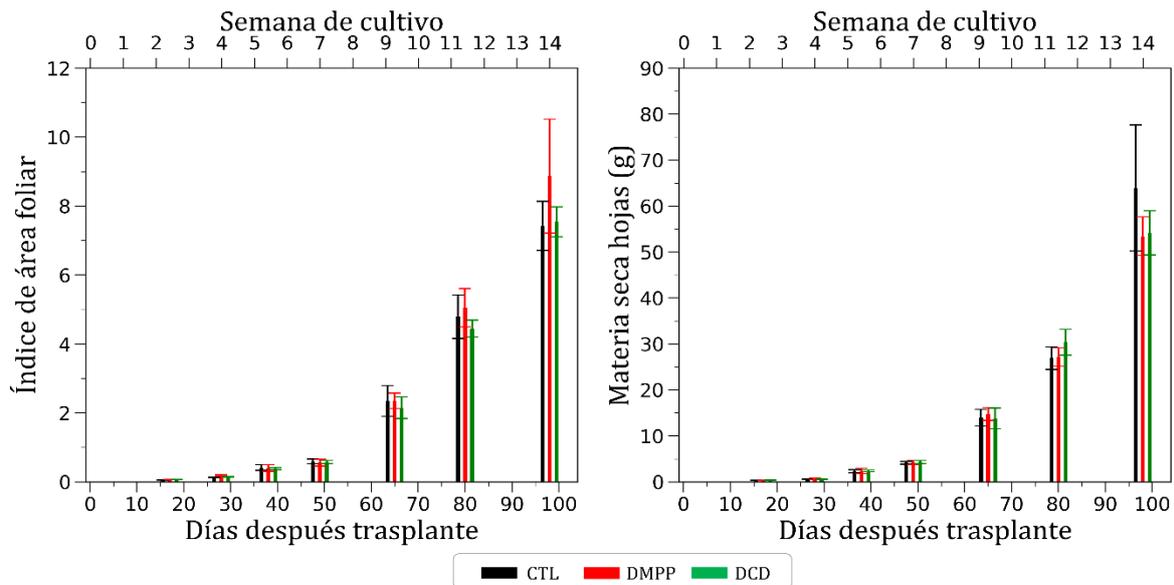


Figura 1. Evolución del índice de área foliar (izquierda) y la materia seca total de hojas (derecha) durante el ciclo de cultivo de lechuga 'Iceberg'. Medias±error estándar, n=3.

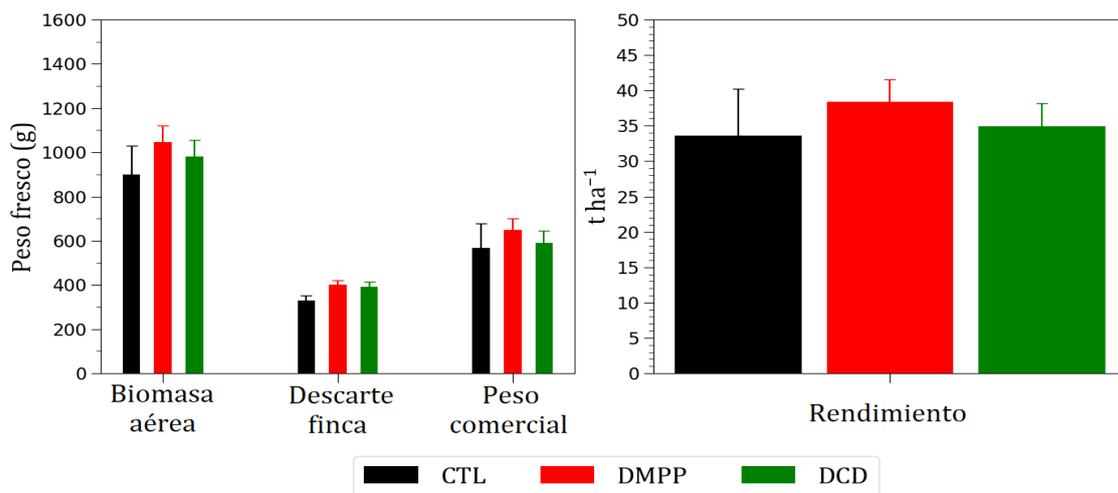


Figura 2. Biomasa fresca (izquierda) y rendimiento (derecha) obtenidas durante la recolección de cultivo de lechuga 'Iceberg'. Medias±error estándar, n=3.

Tabla 1. Parámetros físicos de lechuga 'Iceberg' obtenidos durante la recolección*.

Tratamiento	ASST** (cm ²)	Diámetro (cm)	Alto (mm)	Índice D
CTL	7,72±0,86 a	13,96±0,84 a	10,82±0,53 a	3,98±0,54 a
DMPP	8,31±0,24 a	14,71±0,50 a	11,35±0,30 a	4,38±0,21 a
DCD	8,14±0,15 a	14,40±0,43 a	11,14±0,36 a	4,07±0,24 a

*Medias±error estándar; n=3. Medias para un mismo parámetro con una letra común no son significativamente diferentes con ANDEVA (p>0,05). **ASST: Área de sección transversal del tallo.

Changes in the photosynthetic capacity of cherry trees during drought-recovery cycles

Cambios en la capacidad fotosintética de cerezos sometidos a ciclos de supresión-reanudación del riego

P.J. Blaya-Ros^{1*}, R. Torres Sánchez², V. Blanco Montoya¹, R. Domingo Miguel¹

¹Departamento de Ingeniería Agronómica, ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena. Spain.

²Departamento de Automática, Ingeniería Eléctrica y Tecnología Electrónica, UPCT, Cartagena. Spain.

*pedro.blaya@upct.es

Abstract

Net photosynthesis (A_n) in plants is conditioned by meteorological variables and soil water availability. With the aim of assessing the photosynthetic capacity of 'Lapins' sweet cherry trees exposed to cycles of drought - recovery, an irrigation study was carried out in 2019. The study involved two irrigation treatments: i) control, CTL, irrigated to ensure non-limiting soil water conditions, and ii) severe water deficit, SS, irrigated as CTL until the end of June, and from that moment on, two consecutive drought - recovery cycles were applied. Stem water potential (Ψ_{stem}) and A_n were affected by both intensity and duration of the two drought - recovery cycles. Although during the study photoinhibition was not observed in SS trees, their chloroplasts resulted light-saturated at lower A_n values than those of CTL trees. Regarding Ψ_{stem} , SS trees required a recovery time of 7-10 days after each drought event to reach similar Ψ_{stem} values to those measured in CTL trees.

Keywords: photosynthesis; stem water potential; water stress.

Resumen

La fotosíntesis neta (A_n) de los cultivos está supeditada a las variables climáticas y disponibilidad hídrica. Con el objetivo de evaluar la capacidad fotosintética de cerezos 'Lapins' sometidos a distintos niveles de estrés hídrico se llevó a cabo un ensayo de supresión-reanudación del riego en 2019 que constó de dos tratamientos: i) un control, CTL, regado para satisfacer las necesidades hídricas y ii) otro de déficit hídrico severo, SS, regado como CTL hasta finales de junio, momento a partir del cual se alternaron 2 ciclos consecutivos de supresión-reanudación del riego. El potencial hídrico de tallo (Ψ_{stem}) y A_n se vieron afectados por la intensidad y duración de los periodos de supresión - recuperación. Durante el estudio, no se observó fotoinhibición; sin embargo, A_n requirió menor radiación para saturar los cloroplastos que los árboles CTL. Los árboles de SS precisaron de un periodo de recuperación de 7-10 d después de cada ciclo de supresión para alcanzar valores de Ψ_{stem} similares a árboles CTL.

Palabras clave: fotosíntesis; potencial hídrico de tallo; estrés hídrico

1. INTRODUCCIÓN

En climas áridos y semiáridos, los eventos de sequía, acentuados como consecuencia del cambio climático, son considerados como uno de los principales factores limitantes para el desarrollo vegetativo y productivo de los cultivos. Estos eventos se caracterizan por una combinación de escasez hídrica, altas temperaturas e intensidades lumínicas que puede conducir

a una disminución progresiva de la capacidad fotosintética (1). La resistencia de la planta frente al estrés hídrico dependerá de la duración, intensidad e intermitencia de este. Conforme el suelo se va desecando, la disponibilidad de CO₂ en los cloroplastos se va reduciendo, como consecuencia de un cierre estomático inducido por la limitación hídrica. En niveles de estrés hídrico moderados, las plantas pueden adaptarse y mantener una alta eficiencia en el fotosistema II (PSII); sin embargo, condiciones de sequía extrema pueden conducir a una respuesta de la planta que, generalmente, se caracteriza por disminuciones perjudiciales de los procesos fisiológicos, lo que favorece la fotoinhibición y limita la capacidad fotosintética de las plantas (2). El estudio y la comprensión de la respuesta de las plantas al déficit hídrico puede desempeñar un papel importante para incrementar la eficiencia del uso de los recursos por parte de las plantas, así como para una gestión adecuada de los cultivos para estabilizar su rendimiento en condiciones de sequía.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del estrés hídrico inducido a partir de dos ciclos de supresión-reanudación del riego sobre la fotosíntesis neta y su relación con la radiación fotosintéticamente activa en cerezos (*Prunus avium* L. 'Lapins').

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo fue llevado a cabo durante el periodo junio – septiembre de 2019 (día del año, DDA, 170 – 268) en una parcela perteneciente a la Estación Experimental Agroalimentaria 'Tomás Ferro' (ETSIA-UPCT), ubicada en Cartagena. La plantación de cerezos (*P. avium* L.) 'Lapins'/Mirabolano de 3 años de edad estaba dispuesta a marco de 3,5 m x 2,25 m. El sistema de riego constó de un único lateral con tres emisores por árbol (2,2 L h⁻¹). Al inicio del ensayo se aplicaron dos tratamientos de riego: i) CTL, control, regado con el objetivo de satisfacer las necesidades hídricas totales del cultivo, ii) SS, déficit severo, regado como CTL hasta finales de junio, momento a partir del cual se alternaron 2 ciclos consecutivos de supresión-reanudación del riego. El riego se reanudó al alcanzar un potencial hídrico de tallo (Ψ_{stem}) de -1,6 MPa en el primer ciclo y de -2,3 MPa en el segundo ciclo. Los periodos de recuperación se dieron por finalizados cuando los valores de Ψ_{stem} de SS se igualaron con los de los árboles CTL. Los volúmenes de riego aplicados se determinaron semanalmente según la metodología FAO (3).

El estado hídrico de la planta fue determinado a partir Ψ_{stem} medido a mediodía solar (11:00–13:00 UT) con una cámara de presión tipo Scholander (mod. SF-PRES-70, SolFranc Tecnologías, S.L., España) y siguiendo las indicaciones propuestas por McCutchan y Shackel (4) en 2 hojas por repetición (n=6). Adicionalmente se realizaron 3 curvas por tratamiento de fotosíntesis-radiación fotosintéticamente activa (An/PAR) con sistema de fotosíntesis portable CIRAS2 (PPSystem, USA). La temperatura se mantuvo a 25 °C, la humedad relativa ambiental al 50-70 % y la concentración de CO₂ a 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Cada hoja fue aclimatada a las condiciones de la cubeta al menos durante 5 min, hasta que la fotosíntesis neta (An) y la concentración de CO₂ subestomática fueran completamente estables. Tras ello, se realizó la curva An/PAR con las intensidades lumínicas: 1500, 2000, 1100, 750, 500, 350, 250, 150, 75, 25, 0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El diseño experimental fue de bloques al azar con 3 repeticiones de 4 árboles cada una por tratamiento de riego. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de los datos obtenidos mediante el programa estadístico IBM SPSS Statistics v.24 (Statistical package, USA), mientras que las gráficas se realizaron con Sigmaplot Plus v.12.5 (Systat Software, USA).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estado hídrico de la planta, determinado mediante Ψ_{stem} , se vio influenciado por la restricción hídrica (Fig. 1). Los árboles CTL mantuvieron valores Ψ_{stem} característicos de árboles sin restricción hídrica (Ψ_{stem} medio = -0,62 MPa) y similares a los obtenidos por Blanco et al. (5)

en plantación adulta. Una semana antes de la supresión del riego (DDA 170-176), ambos tratamientos mostraron valores similares de Ψ_{stem} ; sin embargo y tras la supresión del riego en SS, Ψ_{stem} disminuyó paulatinamente hasta alcanzar valores mínimos de -1,64 MPa y -2,40 MPa durante el primer (DDA 176-197) y segundo (DDA 207-242) ciclo de supresión, respectivamente. Los valores mínimos alcanzados durante ambos ciclos de supresión superaron en intensidad los valores límites a partir de los cuales pueden existir efectos trascendentales en cerezo (5,6).

La capacidad fotosintética, al igual que Ψ_{stem} , se vio afectada por la restricción hídrica (Fig. 2). Durante el periodo estudiado, los árboles CTL mostraron valores medios de A_n de 21,37 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a un PAR de 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, observándose, además, que un PAR de 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no es capaz de saturar completamente los cloroplastos, lo que es indicativo de árboles sin restricción hídrica (1). Por el contrario, la capacidad fotosintética del tratamiento deficitario se vio fuertemente afectada por la supresión, obteniéndose valores de A_n cercanos a 7 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en condiciones de estrés severo ($\Psi_{\text{stem}} = -2,40$ MPa). En consecuencia, la planta requiere una menor intensidad de luz para saturar A_n en circunstancias de restricción hídrica, saturándose ésta a un PAR cercano a 350 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para valores de Ψ_{stem} de -1,64 MPa y -2,40 MPa, respectivamente. La capacidad de disipación de la radiación por el cultivo puede disminuir conforme el periodo de sequía se intensifica, provocando fotoinhibición en condiciones de altas intensidades lumínicas (2). Por otro lado, en la primera recuperación (DDA 197-207) se puede observar que, aunque ambos tratamientos alcanzaron valores Ψ_{stem} similares (CTL = -0,61 MPa y SS = -0,68 MPa), la fotosíntesis no fue capaz de recuperarse totalmente, lo que, *a priori*, indica que hubo un daño fotosintético. Sin embargo, durante la segunda recuperación (DDA 242-268), se puede observar que A_n del tratamiento SS se pudo equiparar a CTL, descartando posibles daños fotosintéticos y evidenciando que A_n se recupera más lentamente que Ψ_{stem} .

4. CONCLUSIONES

La capacidad fotosintética se vio influenciada por la intensidad y duración del estrés impuesto a los árboles. Las curvas A_n /PAR muestran que A_n se satura a PAR inferior cuando existe limitación hídrica, además de mostrar una caída importante de A_n en los árboles deficitarios respecto a los árboles CTL. Sin embargo, los niveles de estrés alcanzados no fueron suficientemente pronunciados como para afectar de forma permanente los procesos fisiológicos de la planta o producir fotoinhibición.

5. AGRADECIMIENTOS

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

6. REFERENCIAS

1. Flexas J, Diaz-Espejo A, Gago J, Gallé A, Galmés J, Gulías J, et al. Photosynthetic limitations in Mediterranean plants: A review. *Environ Exp Bot.* 2014;103:12–23.
2. Medrano H, Parry MAJ, Socias X, Lawlor DW. Long term water stress inactivates Rubisco in subterranean clover. *Ann Appl Biol.* 1997;131(3):491–501.
3. Allen RG, Pereira LS, Raes D, Smith M. Crop evapotranspiration. Guidelines for computing crop water requirements. FAO Irrigation and Drainage paper No. 56. Rome, Italy, pp 15–27. 1998.
4. McCutchan H, Shackel KA. Stem-water Potential as a Sensitive Indicator of Water Stress in Prune Trees (*Prunus domestica* L. cv. French). *J Am Soc Hortic Sci.* 1992;117(4):607–11.
5. Blanco V, Domingo R, Pérez-Pastor A, Blaya-Ros PJ, Torres-Sánchez R. Soil and plant water indicators for deficit

irrigation management of field-grown sweet cherry trees. *Agric Water Manag.* 2018;208:83–94.

6. Marsal J, Lopez G, del Campo J, Mata M, Arbones A, Girona J. Postharvest regulated deficit irrigation in “Summit” sweet cherry: Fruit yield and quality in the following season. *Irrig Sci.* 2010;28(2):181–9.

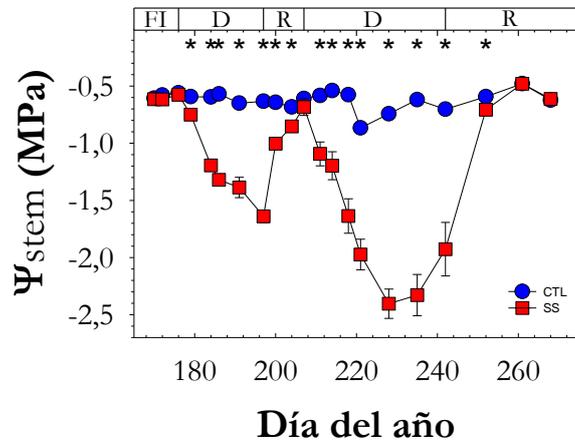


Figura 1. Evolución del potencial hídrico de tallo a mediodía (Ψ_{stem}) durante el periodo de estudio. Cada punto es la media \pm error estándar de 6 medidas por tratamiento. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$). La barra superior corresponde a los ciclos supresión-recuperación a los que fueron sometidos los árboles del tratamiento deficitario. ‘FI’ indica el periodo previo al inicio de los ciclos de supresión-recuperación, cuando ambos tratamientos se regaron como como CTL; ‘D’, periodo de supresión de riego; ‘R’, periodo de recuperación de los árboles.

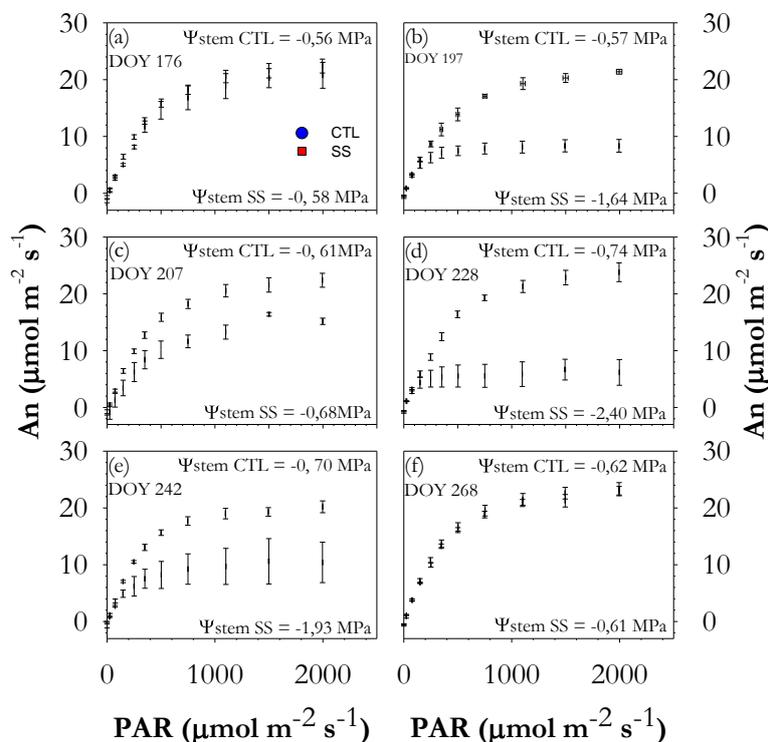


Figura 2. Respuesta de la tasa de asimilación neta (An) a la radiación fotosintética activa (PAR) para los días del año (DOY) 176, 207, 268 árboles SS recuperados (a, d y c, respectivamente) y 197, 228 y 242 árboles SS en periodo de supresión (b, d y e, respectivamente). Cada punto es la media \pm error estándar de 3 medidas por tratamiento.

Physiological behavior of pepper rootstocks versus nematodes

Comportamiento fisiológico de porta-injertos de pimiento frente a nematodos

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

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

²Departamento de Biotecnología y Protección de Cultivos, IMIDA, La Alberca, Murcia. Spain.

*1297@coitarm.es

Abstract

A management challenge in high production systems are diseases transmitted by soil pathogens, such as nematodes, being the grafting with rootstocks with nematode resistance genes a proposal to mitigate these problems. Few studies have been carried out on greenhouses grown peppers under Mediterranean climate conditions. Therefore, we studied a susceptible variety (Gacela) grafted on resistant rootstocks (C19, C25 and RT17), and compared it with non-grafted and self-grafted plants. After inoculation into susceptible rootstocks, leaf photosynthesis was affected by a change in stomatal regulation and photochemical efficiency, leading to imbalances in nutrient concentration and better photosynthesis carbon allocation for the production of biochemical defense compounds. These results identified new ideas in traits that can identify nematode-resistant rootstocks and, therefore, new tools to induce resistance, while avoiding the use of disinfectants in the soil.

Keywords: *Capsicum annuum* L.; grafting; *Meloidogyne incognita*; Gacela.

Resumen

Un desafío de manejo en los sistemas de alta producción son las enfermedades transmitidas por patógenos de suelo, como los nematodos, siendo el injerto con porta-injertos resistentes una propuesta para mitigar estos problemas. Se han realizado pocos estudios en pimiento cultivado en invernaderos bajo condiciones de clima mediterráneo. Por tanto, estudiamos una variedad susceptible (Gacela) injertada en porta-injertos resistentes (C19, C25 y RT17), y la comparamos con plantas no injertadas y autoinjertadas (GAL). Después de la inoculación en los portainjertos susceptibles, la fotosíntesis de la hoja se vio afectada por una modificación en la regulación estomática y en la eficiencia fotoquímica, lo que condujo a desequilibrios en la concentración de nutrientes y a una mejor asignación del carbono de la fotosíntesis para la producción de compuestos bioquímicos de defensa. Estos resultados proporcionan nuevas ideas en los rasgos que pueden identificar portainjertos resistentes a nematodos y, por lo tanto, nuevas herramientas para inducir resistencia, mientras evitamos el uso de desinfectantes en el suelo.

Palabras clave: *Capsicum annuum* L.; injerto; *Meloidogyne incognita*; Gacela.

1. INTRODUCCIÓN

En la producción hortícola bajo plástico las condiciones de suelo ideal (relativamente cálido, húmedo y con textura adecuada) y el cultivo intensivo pueden ofrecer un perfecto escenario para

que las poblaciones de nematodos puedan aumentar hasta niveles perjudiciales (1). El injerto se usa en muchos países en cultivos protegidos, en los cuales la tierra se usa de forma continuada y no se rotan los cultivos, lo que permite mejoras tanto en productividad como en la calidad de la fruta (2). Además, la elección correcta del porta-injertos es de suma importancia para el rendimiento de un cultivo vulnerable (3). El objetivo de este trabajo fue obtener información del efecto provocado por los nematodos en la fisiología y en la producción de plantas injertadas en tres portainjertos diferentes, plantas no injertadas y autoinjertadas, comparando sus habilidades para mitigar este importante estrés biótico.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Se estudiaron plantas de la variedad Gacela 'F1' (Syngenta Seeds), autoinjertadas (GAL) e injertadas sobre 3 porta-injertos: Atlante (C25) y C19 (Ramiro Arnedo Seeds S.A.) y Robusto (RT17) (Syngenta Seeds S.A.). Se usaron como control, plantas de Gacela sin injertar e injertadas sobre los mismos porta-injertos sin inocular. Todas las plantas se cultivaron e inocularon de forma individual con 2.400 J2 de nematodos de una población de *Meloidogyne incognita* en contenedores de 10 L.

2.2 Intercambio gaseoso

El intercambio de agua y gases, la fluorimetría y la cantidad relativa de clorofila se determinaron en 6 hojas totalmente desarrolladas de cada tratamiento en la fase generativa de la planta. Las medidas se realizaron a los 172, 182, 188, y 196 d después del trasplante, de 9:00 a.m. a 11:00 a.m. La tasa de asimilación neta de CO₂ (Pn), conductancia estomática (gs), tasa de transpiración (E) y eficiencia en el uso del agua (Pn/E) se midieron en condiciones constantes de saturación de luz (800 mmol/m²s) y 400 ppm de CO₂ con un medidor de fotosíntesis portátil LI-6400 (LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska, USA). La clorofila se determinó mediante un fluorómetro ADC FIM 1500 de pulso de amplitud modulada (Analytical Development Company Ltd., Hoddesdon, Reino Unido) y la cantidad relativa de clorofila en hojas (SPAD) se determinó con un Minolta SPAD-502m (Konica Minolta Optics, Inc., Japón).

2.2 Índice de agallas y producción

Se determinó la incidencia de *M. incognita* mensualmente en 3 plantas anotando el índice de agallas (IA) (4).

Se recolectaron los frutos de 20 plantas (5 plantas por bloque, 4 bloques). La calidad de la producción comercial se evaluó de acuerdo a las prácticas comerciales, descartándose los frutos con desordenes fisiológicos (soleados, blossom-end-rot, etc.) que no eran comerciales.

2.3 Diseño experimental y análisis estadístico

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

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tasa de asimilación de CO₂ (Fig. 1A y B) y la conductancia estomática (Fig. 1C y D) se vieron gravemente afectadas después de la inoculación en plantas no injertadas, y al final del ensayo los valores de estos parámetros se redujeron en un 62,8 % y 88,1 %, respectivamente, en comparación con el control (sin injertar y sin inocular). Las plantas autoinjertadas mostraron un menor impacto, pero los valores de ambos parámetros se redujeron con respecto a las plantas control en un 34,5 % y 57,4 %, respectivamente. Claramente, C19 y RT17 mostraron mayores

tasas fotosintéticas y de conductancia estomática que las plantas autoinjertadas (GAL) y no injertadas, después de la inoculación, y al final del ciclo de cultivo. Nuestros datos muestran el impacto diferencial de los porta-injertos en la eficiencia del uso del agua y, especialmente, conductancia estomática, que se vio gravemente afectada en plantas no injertadas después de la inoculación. La fotosíntesis de la hoja también se redujo en las plantas en porta-injertos susceptibles. Melakeberhan et al. (5) indicaron que en soja *M. incognita* puede contribuir a la abscisión prematura de las hojas y clorosis, que puede afectar a la fotosíntesis.

La fluorescencia de la clorofila de la hoja no se alteró significativamente cuando las plantas no fueron inoculadas (Fig. 1G) y los distintos tratamientos mantuvieron valores de entre 0,75 y 0,8. La inoculación diferencial afectó esta respuesta, y las plantas GAL y RT17 mantuvieron los mismos valores que las plantas no inoculadas. El resto de los tratamientos mostraron reducción en sus valores, pero no inferiores a 0,75 (Fig. 1H). Por el contrario, los valores SPAD se vieron más afectados, especialmente en la última fecha de muestreo (Fig. 1J), cuando las plantas no injertadas y el porta-injertos C25 tenían unos valores de SPAD que fueron 31 % y 26 % más bajos, respectivamente, en comparación con el porta-injertos no inoculado. Los valores de SPAD no se modificaron para RT17 después de la inoculación.

Con respecto al índice de agallas, las plantas no injertadas tuvieron mayores valores, mientras que C25 y C19 se vieron relativamente menos afectadas, con disminuciones en el índice de agallas (IA) de 26,3 % y 38,9 %, respectivamente, en la última evaluación, en comparación con las plantas no injertadas (Fig. 1). Las plantas autoinjertadas (GAL) mostraron una reducción moderada en el IA (8,9 %), pero el porta-injertos RT17 no mostró progresión en cuanto a la afección, lo que indica su mayor tolerancia a *M. incognita*.

La gravedad de los síntomas de los nematodos en las plantas de pimiento se reflejó visiblemente en el rendimiento (Fig. 2B), como era de esperar. La interacción del porta-injertos/injerto puede afectar potencialmente al rendimiento y la calidad de los frutos, mientras confiere tolerancia a este estrés biótico (6). Primero, en ausencia de nematodos el porta-injertos modifica significativamente la respuesta de la variedad, aunque, plantas injertadas sobre C19 o RT17 dieron más bajos rendimientos que las sin injertar, autoinjertadas y C25. Sin embargo, la combinación porta-injertos/variedad que mostró más bajos rendimientos bajo condiciones control se vio menos afectada por los nematodos y en contraste las no injertadas, autoinjertadas y C25 mostraron mayores impactos. Por lo tanto, los efectos combinados de los nematodos en el intercambio de gases en las hojas fueron menos severos para RT17 y C19; sin embargo, dichos portainjertos no mostraron mayores rendimientos en la ausencia de infestación (en comparación con portainjertos susceptibles o plantas sin injertar). Este notable resultado indica que estos portainjertos resistentes a nematodos pueden ofrecer ventajas significativas solo para suelos infestados.

4. CONCLUSIONES

Futuros estudios deben analizar el deterioro producido por *M. incognita* en la regulación estomática y en la eficiencia del PSII, ya que ambos reducen la tasa de fotosíntesis y, en consecuencia, el crecimiento y rendimiento de las plantas.

5. REFERENCIAS

1. Aguiar JL, Bachie O, Ploeg A. Response of Resistant and Susceptible Bell Pepper (*Capsicum annuum*) to a Southern California Meloidogyne *incognita* Population from a Commercial Bell Pepper Field. *J Nematol.* 2014;46(4):346-51.
2. Kyriacou MC, Roupael Y, Colla G, Zrenner R, Schwarz D. Vegetable grafting: The implications of a growing agronomic imperative for vegetable fruit quality and nutritive value. *Front Plant Sci.* 2017;8:741.
3. López-Pérez J.A., Le Strange M, Kaloshian I, Ploeg AT. Differential response of Mi gene-resistant tomato

rootstocks to root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*). Crop Prot. 2006;25:382–8.

- Bridge J, Page SLJ. Estimation of root-knot nematode infestation levels on roots using a rating chart. Trop Pest Manag. 1980;26(3):296–8.
- Melakeberhan H, Webster JM, Brooke RC, D'Auria JM, Cackette M. Effect of *Meloidogyne incognita* on Plant Nutrient Concentration and Its Influence on the Physiology of Beans. J Nematol. 1987;19(3):324–30.
- King SR, Davis AR, Liu W, Levi A. Grafting for disease resistance. HortScience. 2008;43(6):1673–6.

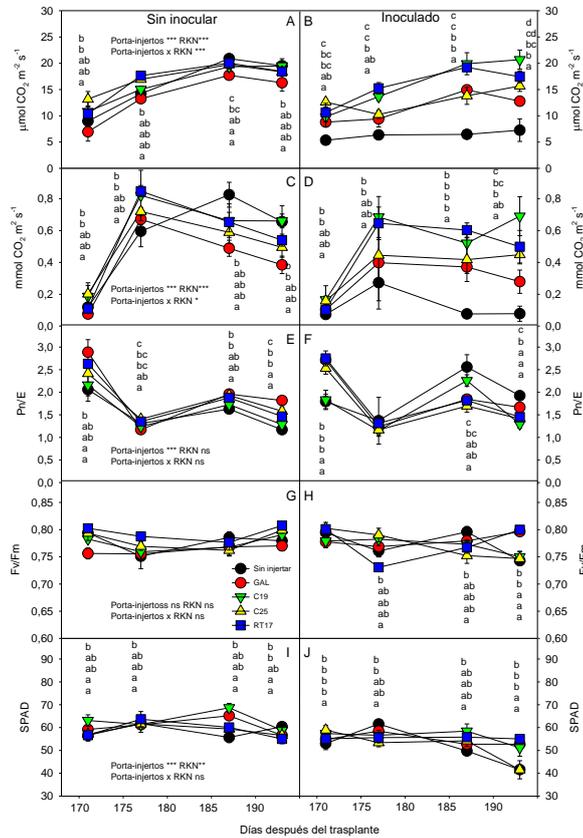


Figura 1. Efectos de la inoculación con *M. incognita* sobre fotosíntesis neta (A, B), conductancia estomática (C, D), uso eficiente del agua (E, F), fluorescencia de las clorofilas (G, H), y contenido relativo de clorofila (I, J). Letras diferentes dentro de una columna y gráfico indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos. Los valores son las medias ($n=20 \pm SE$). Análisis de varianza para cada parámetro: ns, no significativo; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,001$.

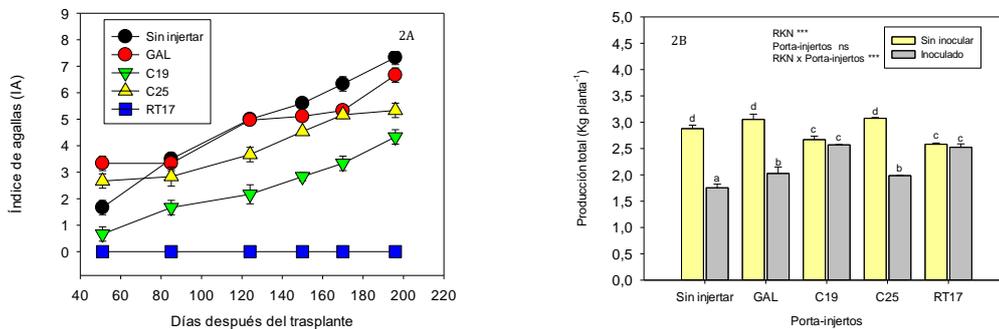


Figura 2. Progresión del índice de agallas después de la inoculación con *M. incognita* (2A). Efectos de la inoculación con *M. incognita* sobre la producción total (2B). Letras diferentes dentro de una columna y gráfico indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos. Los valores son las medias ($n=20 \pm SE$). Análisis de varianza para cada parámetro: ns, no significativo; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,001$.

Irrigation protocols in table grapes according to irrigation water availability

Protocolos de riego en uva de mesa según disponibilidad de agua de riego

A. Temnani-Rajjaf*, A. Pérez-Pastor

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

*abdelmalek.temnani@edu.upct.es

Abstract

Regulated Deficit Irrigation (RDI) strategies allow to save water without generating losses in the production and quality of the crops and thus, increase the efficiency in the use of irrigation water. However, they must be adjusted to the farmer's water supply for each year. A study was carried out on Crimson Seedless table grapes during the years 2015 to 2017 with the aim of developing irrigation protocols adaptable to irrigation water availability. Stem water potential at midday was a very sensitive indicator of plant water status and irrigation scheduling adjusted to values close to -0.65 MPa did not affect production or quality.

Keywords: RDI; sustainable; stem water potential; water scarcity.

Resumen

Las estrategias de Riego Deficitario Controlado (RDC) permiten ahorrar agua sin generar pérdidas en la producción y calidad de las cosechas y así, incrementar la eficiencia en el uso del agua de riego. No obstante, deben ajustarse a la dotación hídrica del agricultor para cada año. Se realizó un estudio en uva de mesa Crimson Seedless durante los años 2015 a 2017 con el objetivo de elaborar protocolos de riego adaptables a la disponibilidad de agua de riego. El potencial hídrico de tallo a mediodía fue un indicador del estado hídrico de la planta muy sensible al déficit hídrico y la programación del riego ajustada a valores próximos a -0,65 MPa no afectó a la producción ni calidad.

Palabras clave: RDC; sostenible; potencial hídrico de tallo; escasez hídrica.

1. INTRODUCCIÓN

En los próximos años se espera que el efecto del cambio climático en la región mediterránea produzca un incremento en la temperatura y una disminución de las precipitaciones, así como cambios en su distribución estacional; afectando la disponibilidad de agua para el riego (1). Estas condiciones junto a la alta demanda evaporativa propias de la zona exigen a los agricultores un esfuerzo adicional en el manejo del agua de riego para obtener una producción sostenible. Bajo este escenario, las estrategias de Riego Deficitario Controlado (RDC) permiten ahorrar agua sin generar pérdidas en la producción y calidad de las cosechas y así, incrementar la eficiencia en el uso del agua de riego (2). Sin embargo, esta estrategia se debe aplicar atendiendo al volumen de agua de riego del que disponen los agricultores, por lo que el objetivo principal de este trabajo fue desarrollar protocolos de riego en uva de mesa según disponibilidad de agua de riego.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en una finca comercial de uva de mesa 'Crimson seedless' sobre un marco de plantación de 3,5 x 3 m, ubicada en Molina de Segura entre los años 2015 y 2017. Se establecieron dos tratamientos de riego con tres repeticiones de 6 árboles distribuidas al azar: i) tratamiento control (CTL), sin condiciones limitantes de agua en el suelo (110 % ETc) y ii) tratamiento deficitario (RDC), en el que se redujo la cantidad de agua aplicada en 57 % respecto a CTL.

Para controlar el estado hídrico, se realizó un seguimiento del potencial hídrico de tallo a mediodía solar (Ψ_T) cada 10 d mediante una cámara de presión tipo Scholander a hojas cubiertas con film aluminizado dos horas previas de la medida (3,4). En la recolección se determinó la carga frutal expresada como kg y número de racimos por parra; y los racimos se caracterizaron según el número de bayas, peso total y peso medio de las bayas. La producción total correspondió a la suma de los racimos cosechados en cada recolección y se determinó la eficiencia del uso del agua de riego (EUA) como el cociente entre la producción y el riego aplicado. La calidad de la fruta se evaluó mediante la determinación de la acidez titulable, sólidos solubles totales y el índice de madurez.

Los datos agroclimáticos se obtuvieron a través de la estación Molina de Segura "Campotejar" perteneciente a la red del Sistema de Información Agrario de Murcia (SIAM).

Se realizó un análisis de varianza y cuando se detectaron diferencias entre tratamientos las medias se separaron mediante la prueba de comparaciones múltiples de Duncan a un 5 % de significancia.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante los tres años de estudio CTL presentó valores mínimos de potencial hídrico en pre y post-envero superiores a -0.5 MPa, y RDC próximos a -0.65 MPa que concuerdan con valores para vides bien regadas según Conesa *et al.* (3). Diversos autores señalan que el potencial de tallo es uno de los indicadores más sensibles para determinar el estado hídrico de la planta (4), por lo que estos umbrales de Ψ_T permiten programar el riego de manera eficiente según la disponibilidad hídrica puesto que no se observaron diferencias significativas en la producción al regar en base a estos umbrales, observándose incluso en el último año de estudio un incremento significativo en la producción de un 40,2 % (Fig. 1).

Durante la temporada 2015, no se detectaron diferencias significativas en el número de racimos por parra (≈ 16), peso medio del racimo (≈ 350 g) ni en el peso medio de las bayas ($\approx 4,75$ g). Sin embargo, el número de bayas por racimo fue significativamente mayor en RDC, correspondiendo a un 51 % más que CTL (Tabla 1). Durante el año 2016, la carga frutal fue significativamente superior al año anterior y RDC presentó un mayor número de racimos por parra, aunque de menor peso y con una menor cantidad de bayas, no viéndose afectado el peso de éstas (Tabla 1). La obtención en el segundo año de menor bayas por racimo en RDC, así como racimos más pequeños se compensa con una mayor carga de racimos por parra. En el año 2017 la tendencia fue similar a 2016, aunque el rendimiento por parra fue significativamente superior en RDC. No se detectó efecto del déficit hídrico sobre los parámetros de calidad evaluados.

4. CONCLUSIONES

El potencial hídrico de tallo a mediodía ha mostrado ser en este estudio un indicador del estado hídrico de la planta muy sensible al déficit hídrico y la programación del riego ajustada a valores próximos a -0,65 MPa no afecta a la producción ni calidad.

El uso de esta estrategia incrementó la carga frutal expresada en número de racimos por parra en el último año.

Estos resultados complementados con otros estudios permitirán desarrollar protocolos de riego sostenibles que permitan ajustar los aportes hídricos en base a la disponibilidad estacional durante las distintas temporadas de cultivo.

5. AGRADECIMIENTOS

Proyecto IRRIMAN LIFE+ Implementation of efficient irrigation management for sustainable agriculture LIFE13 ENV/ES/000539.

6. REFERENCIAS

1. Rocha J, Carvalho-Santos C, Diogo P, Beça P, Keizer JJ, Nunes JP. Impacts of climate change on reservoir water availability, quality and irrigation needs in a water scarce Mediterranean region (southern Portugal). *Sci Total Environ.* 2020;736:139477.
2. Zhang H, Oweis T. Water-yield relations and optimal irrigation scheduling of wheat in the Mediterranean region. *Agric Water Manag.* 1999;38(3):195–211.
3. Conesa MR, Torres R, Domingo R, Navarro H, Soto F, Pérez-Pastor A. Maximum daily trunk shrinkage and stem water potential reference equations for irrigation scheduling in table grapes. *Agric Water Manag.* 2016;172:51–61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agwat.2016.04.011>
4. Klepper B. Diurnal Pattern of Water Potential in Woody Plants. *Plant Physiol.* 1968;43(12):1931-4. www.plantphysiol.org

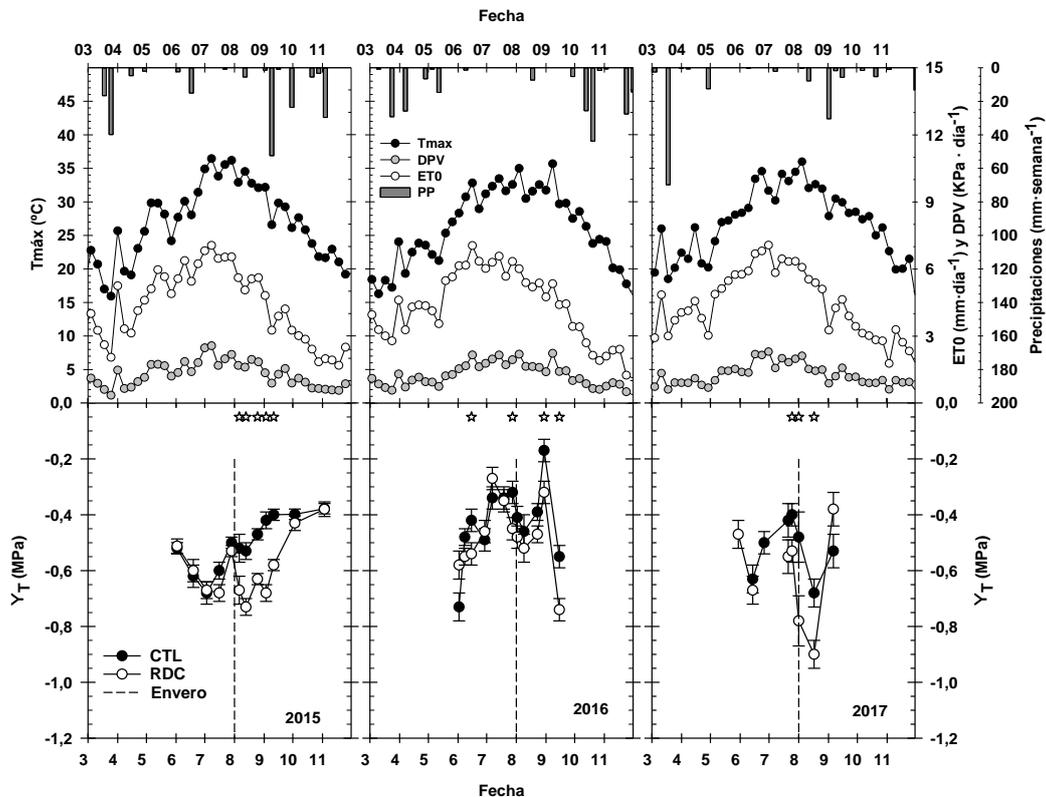


Figura 1. Evolución de los parámetros climáticos (arriba) y del potencial hídrico de tallo (abajo) para los años de estudio orientados verticalmente. Tmáx: temperatura máxima; DPV: déficit de presión de vapor; ET₀: evapotranspiración de referencia y PP: precipitaciones.

Tabla 1. Producción, carga frutal y características del racimo para tratamientos de riego de los años 2015 a 2017.

	kg por parra	Número de racimos	Bayas por racimo	Peso racimo (g)	Peso baya (g)
2015					
CTL	23,9±2,1 b	15,4±2,94	54,3±4,61 a	325,14±31,8	4,71±0,04
RDC	21,5±2,1 ab	16,7±3,83	82,16±10,24 b	385,53±39,9	4,85±0,08
2016					
CTL	32,2±2,4	27,8± 2,28 a	148,55±7,91 b	781,1±41,6 b	5,25±0,19
RDI	31,5±2,5	47,0± 5,8 b	108,79±4,65 a	590,74±25,2 a	5,43±0,29
2017					
CTL	15,7±2,6 a	29,8±6,87 a	sd	sd	4,21±0,14
RDI	28,3±3,8 c	52,7±10,28 b	sd	sd	4,16±0,15
Tto.	ns	**	*	ns	ns
Año	***	***	***	***	***
Tto. * año	**	**	***	***	ns

Medias para cada columna con letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Duncan ($p < 0,05$). *, **, *** indican $p = 0,05$, 0,01 y 0,001, respectivamente; ns = no significativas.

Designing and developing of computer-based techniques for helping agronomical research and precision farming

Diseño y desarrollo de técnicas basadas en ordenador para ayudar en la investigación agronómica y en la agricultura de precisión

M. Forcen^{1*}, N. Pavon², J.A López², A. Pérez¹

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

²Departamento de Automática, Ingeniería Eléctrica y Tecnología Electrónica, ETSII, UPCT, Campus Muralla del Mar, C/ Doctor Fleming s/n, 30203 Cartagena. Spain.

*manuel.forcen@edu.upct.es

Abstract

This document shows a detailed explanation about a new machine learning-based technique which allows a computer to detect automatically the phenological stage of a citrus crop tree from a picture taken using a standard camera. This will help autonomous systems to determine when deficit irrigation could be applied.

Keywords: artificial intelligence; computer vision; wireless sensor networks; irrigation decision support systems.

Resumen

Este documento muestra una explicación detallada acerca de una nueva técnica, basada en *machine learning*, que permite a un ordenador detectar de forma automática la fase fenológica de un árbol de un cultivo de cítricos usando una cámara estándar. Esta técnica ayudará en la aplicación automática de técnicas de riego deficitario.

Palabras clave: inteligencia artificial; visión por computador; redes inalámbricas de sensores; sistema de soporte de decisión de riego.

1. INTRODUCCIÓN

La agricultura consume una gran cantidad de agua. Concretamente se utiliza un 70 % en tareas relacionadas con el riego de los cultivos. También se considera una fuente clave de contaminación difusa por la aplicación de nutrientes de forma ineficiente.

Con los nuevos retos que presenta el cambio climático relativos a la disminución de los recursos hídricos (1), es importante que se desarrollen técnicas y dispositivos que permitan realizar aplicaciones eficientes de dichos recursos para asegurar la disponibilidad del alimento.

En la actualidad existen diversas técnicas que permiten reducir el volumen de agua aplicada a los cultivos. En concreto, algunos de esos métodos consisten en controlar la humedad del suelo para evitar lixiviados, mientras que otros están enfocados en el aprovechamiento del conocimiento sobre el cultivo para restringir la aplicación de agua cuando ésta es menos productiva (2).

Según lo anterior, se ha desarrollado una técnica de bajo coste que facilita la detección automática de la fase fenológica del cultivo, usando una cámara estándar de uso común. Esto

permitiría la automatización del proceso de extracción de información relevante a partir de la cual es posible determinar el estado de dicho cultivo, para, posteriormente, utilizarla como entrada en sistemas automáticos de riego.

Por último, se también se destacan algunos avances en materia de dispositivos que facilitarían el proceso de instalación de sensores con un coste muy inferior a las alternativas tradicionales.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El proceso seguido para desarrollar la técnica propuesta se detalla en las secciones siguientes. Cada una de ellas se refiere a un paso concreto de dicho proceso.

2.1 Conjunto de datos

Se han tomado diversas imágenes a lo largo del ciclo de cultivo de un campo de mandarinos. Un ejemplo de estas imágenes se muestra en la Fig. 1.

Los datos de la etapa fenológica para el entrenamiento de la red neuronal en la que se basa el sistema se han extraído de forma manual, atendiendo a los criterios de la escala BBCH adaptada a cítricos (3).

2.2 Preprocesado de datos

Para evitar la inclusión de zonas de la imagen poco relevantes para el algoritmo, las imágenes se han dividido en 24 partes rectangulares y se ha despreciado el borde exterior, de forma que sólo los centros de las imágenes han formado parte del conjunto de datos de entrenamiento. Posteriormente, estas imágenes se han escalado a un tamaño de 256 píxeles de ancho por 256 píxeles de alto.

2.3 Métodos

Para llevar a cabo el diseño de la arquitectura y los procesos de entrenamiento y validación de la red neuronal, se ha utilizado la biblioteca *Tensorflow* (4), que permite simplificar el desarrollo matemático y computacional. En concreto, se ha desarrollado una red neuronal convolucional que admite una imagen de 256 por 256 píxeles como entrada. La estructura de la red de la que se parte para hacer los experimentos se muestra en la Fig. 2. A partir de la imagen de entrada, la red infiere un valor en el intervalo $[0,1] \in \mathbb{R}$, correspondiente al estado fenológico del fruto, donde 1 se corresponde con que el fruto está listo para su recolección. Por tanto, se trata de un problema de regresión.

En la fase de entrenamiento, se ha utilizado el algoritmo de optimización *Adam* (5). En concreto, el valor que se usa para optimizar la salida de la red neuronal es el error cuadrático medio. El conjunto de imágenes adquiridas se ha dividido en un conjunto de entrenamiento, disponible durante la fase del entrenamiento de la red, y un conjunto no presentado a dicha red durante dicha etapa, denominado conjunto de validación.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para seleccionar el algoritmo definitivo, se ha realizado dos experimentos. En el primero se analiza la importancia del número de neuronas en una única capa, mientras que en el segundo se comparan redes con distintas estructuras, añadiendo una segunda capa y modificando los tamaños de la primera.

En el primer experimento se ha variado el número de neuronas en las capas ocultas para ver cuál es el requerimiento mínimo para obtener una precisión adecuada. Tal y como se puede

ver en la Fig. 3, hay un valor mínimo de neuronas requeridas para obtener un valor aceptable de precisión, pero se puede ver que hay un punto en el que no mejora la precisión.

El segundo experimento consiste en analizar la importancia del número de las capas convolucionales y sus parámetros. Para ello se varía la estructura de la red neuronal para obtener los distintos resultados. Estos datos se muestran en la Tabla 1.

Finalmente, se puede observar que los mejores resultados se obtienen con la configuración de dos capas. Esto conlleva una mayor cantidad de cálculos, pero los errores obtenidos son muy pequeños, con lo que la precisión de la predicción es alta.

4. CONCLUSIONES

Este trabajo demuestra la fiabilidad de usar técnicas basadas en *Machine learning* y *Deep learning* para extraer características de las plantas a partir de imágenes. Las arquitecturas desarrolladas en este trabajo serán un punto de partida útil para otros proyectos que se basen en estas técnicas.

Finalmente, se han analizado y comparado distintas arquitecturas de redes neuronales para definir cuáles son los requerimientos estructurales mínimos para obtener resultados precisos.

5. TRABAJOS FUTUROS

Además del algoritmo detallado en este trabajo, se están desarrollando dispositivos que permitan realizar la sensorización de suelos, de forma que se pueda optimizar el riego obteniendo información del estado del suelo y del ambiente.

Para ello, se está desarrollando una plataforma que consiste en un registrador de datos de bajo coste al que se le conecten diversos sensores. Los datos se guardan internamente de manera local y posteriormente se descargan en un ordenador. Además, se está dotando de conectividad inalámbrica de largo alcance para poder conectar directamente con servidores de Internet.

6. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Investigación e Innovación del Gobierno de España (PCIN-2017-091, WaterWorks2015 ERA-NET) y Manuel Forcen agradece la financiación del contrato predoctoral recibido de la Fundación Séneca (20767/FPI/18).

7. REFERENCIAS

1. Misra AK. Climate change and challenges of water and food security. *Int J Sustain Built Environ*. 2014;3(1):153-65.
2. Conesa MR, Rosa JM de la, Artés-Hernández F, Dodd IC, Domingo R, Pérez-Pastor A. Long-term impact of deficit irrigation on the physical quality of berries in 'Crimson Seedless' table grapes. *J Sci Food Agric*. 2015;95(12):2510-20.
3. Agustí M, Zaragoza S, Bleiholder H, Buhr L, Hack H, Klose R, et al. The BBCH scale for describing phenological stages in citrus development. En: *International congress of citriculture*. 2002;445-6.
4. Martín Abadi, Ashish Agarwal, Paul Barham, Eugene Brevdo, Zhifeng Chen, Craig Citro, et al. TensorFlow: Large-Scale Machine Learning on Heterogeneous Systems [Internet]. 2015. Disponible en: <https://www.tensorflow.org/>

5. Kingma DP, Ba J. Adam: A Method for Stochastic Optimization. Int Conf Learn Represent. 22 de diciembre de 2014.



Figura 1. Ejemplo de imagen capturada incluida en los conjuntos de entrenamiento o validación.

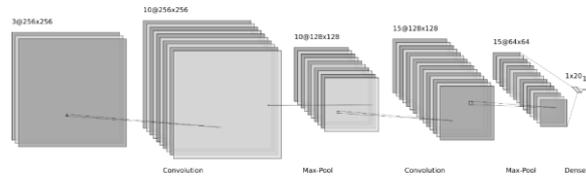


Figura 2. Estructura de la red neuronal diseñada para resolver el problema de regresión planteado.

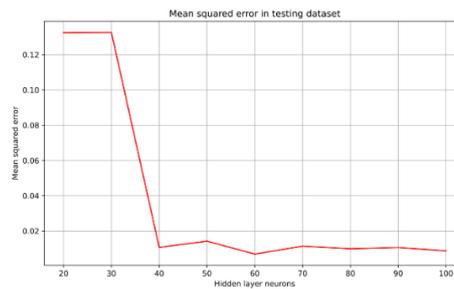


Figura 3. Error final obtenido en función del número de neuronas ocultas seleccionado.

Tabla 1. Comparativa entre estructuras de la red neuronal.

Capas convolucionales	1	1	2
Filtros convolucionales	10	10	10→15
Tamaño de filtros	4	8	4→5
Media del error	0,1111	0,0396	0,0137
Varianza del error	0,0054	0,0025	0,0000

Effect of salinity and resistance induction using methyl jasmonate on growth and phytochemical properties of sea fennel

Efecto de la salinidad y de la inducción de resistencia utilizando metiljasmonato sobre el crecimiento y las propiedades fitoquímicas del hinojo marino

M. Hatim Labiad^{1,3*}, M. Carmen Martínez-Ballesta^{1,2}, A. Giménez¹, J.A. Fernández^{1,2}, M. Tabyaoui³, C. Egea-Gilabert^{1,2}

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

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

³Laboratory of Materials, Nanotechnologies and Environment, University Mohamed V Agdal, Faculty of Sciences, 4 Av. Ibn Battouta, B.P. 1014 RP, M-10000 Rabat. Morocco.

*med.hatim.labiad@gmail.com

Abstract

Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) is an herbaceous aromatic and edible halophyte, naturally occurring in coastal areas of the Mediterranean basin. In this study, the effect of salinity and resistance induction using methyl jasmonate (MeJa) on the growth and phytochemical properties (phenols, total flavonoids and antioxidant capacity) of sea fennel was evaluated. The plants treated by MeJa showed similar values of phenolic compounds than the control plants, while the saline treatment significantly decreased its leaf content. Regarding flavonoids, salinity and MeJa significantly increased the values compared to the controls. The antioxidant capacity was not affected by any treatment. The results show that the treatment with MeJa alleviated the negative effects of salinity on growth without affecting the phytochemical composition of the plant under conditions of saline stress.

Keywords: antioxidant capacity; phenolic contents; *Crithmum maritimum* L.; saline stress.

Resumen

El hinojo marino (*Crithmum maritimum* L.) es una halófito herbácea, aromática y comestible, que se produce naturalmente en las zonas costeras de la cuenca mediterránea. En este estudio, se ha evaluado el efecto de la salinidad y la inducción de resistencia mediante metiljasmonato (MeJa) en el crecimiento y las propiedades fitoquímicas (fenoles y flavonoides totales, capacidad antioxidante) del hinojo marino. Las plantas tratadas con MeJa mostraron valores similares de compuestos fenólicos que las plantas control, mientras que el tratamiento salino disminuyó significativamente su contenido en hojas. Respecto a los flavonoides, la salinidad y el MeJa aumentaron significativamente los valores respecto a los controles. La capacidad antioxidante no se vio afectada por ningún tratamiento. Los resultados muestran que el tratamiento con MeJa alivió los efectos negativos de la salinidad sobre el crecimiento sin afectar a la composición fitoquímica de la planta bajo estrés salino.

Palabras clave: capacidad antioxidante; compuestos fenólicos; *Crithmum maritimum* L.; estrés salino.

1. INTRODUCCIÓN

Crithmum maritimum L., también conocido como hinojo marino, es una halófito aromática, de 20–50 cm de altura, con hojas suculentas, glabras y glaucescentes, divididas en foliolos lanceolados lineales (1).

La salinidad es uno de los factores limitantes de la producción agrícola y causa efectos adversos en la germinación, en el vigor y en la producción de los cultivos (2). Los altos niveles de salinidad afectan a la planta de diferentes formas: estrés hídrico, toxicidad iónica, desordenes nutricionales, estrés oxidativo, alteración de los procesos metabólicos, desordenes a nivel de las membranas, reducción del crecimiento y desarrollo celular, así como genotoxicidad (3–4).

Crithmum maritimum L. puede tolerar altas concentraciones de sal, aunque si se sobrepasan ciertos umbrales de concentración el crecimiento de la planta puede inhibirse considerablemente.

Este trabajo pretende profundizar en el posible efecto protector del metiljasmonato (MeJa) para mitigar los efectos negativos de la salinidad sobre el crecimiento y las propiedades fitoquímicas del hinojo marino.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Las plantas de hinojo marino (que tenían 5 d de edad desde que se sembraron) se cultivaron en bandejas flotantes (5) en un invernadero de la Estación Experimental Agroalimentaria de la UPCT. Cuando las plantas tenían 1 mes se sometieron a los siguientes tratamientos durante 30 d: Control 1: plantas sin tratamiento (Con1); Control 2: plantas tratadas foliarmente con Tween 20 (1 ml L⁻¹) + Etanol 0,2 % (Con2); plantas cultivadas en NaCl 150 mM (NaCl); plantas tratadas con MeJa 0,5 mM diluido en Tween 20 (1 mL L⁻¹) + Etanol 0,2 % (MeJa); plantas cultivadas en NaCl 150 mM y tratadas con MeJa 0,5 mM diluido en Tween 20 (1mL L⁻¹) + Etanol 0,2 % (NaCl+MeJa).

El NaCl se aplicó directamente a la disolución nutritiva durante 1 mes, mientras que el MeJa se aplicó vía foliar en forma de spray (100 mL) 3 veces (cada 10 d) en los correspondientes tratamientos a las plantas.

Diez plantas por tratamiento se recolectaron después de 2 meses de cultivo y se determinó el peso fresco como medida de crecimiento. Posteriormente se congelaron en N₂ líquido y se liofilizaron para los análisis posteriores.

2.2. Determinaciones fitoquímicas

La capacidad antioxidante de las muestras de hoja se evaluó en términos de su capacidad para desactivar el radical DPPH de acuerdo con Brand-Williams et al. (6), con las modificaciones descritas por Pérez-Tortosa et al. (7).

El contenido fenólico total de las muestras de hoja se determinó mediante el método colorimétrico de FolinCiocalteu, modificado por Everette et al. (8).

El contenido en flavonoides se evaluó con AlCl₃ según el método Meda et al. (9).

Los análisis estadísticos se realizaron con SPSS Release 18 para Windows. Se determinaron diferencias significativas entre los valores de todos los parámetros a P≤0,05, según la prueba de Tukey.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El mayor contenido en compuestos fenólicos se alcanzó en las plantas tratadas con MeJa y en los controles 1 y 2 (901,49±9,71 mg GAE kg⁻¹ FW; 891,78±15,79 mg GAE kg⁻¹ FW y 883,09±8,11

mg GAE kg⁻¹ FW, respectivamente) (Fig. 1), mientras que los valores más bajos se obtuvieron para NaCl y MeJa+NaCl con 833,53±9,42 mg GAE kg⁻¹ FW y 844,39±7,08 mg GAE kg⁻¹ FW, respectivamente. Además, los tratamientos con NaCl y MeJa aumentaron el contenido en flavonoides respecto a los controles 1 y 2, pero sin diferencias significativas entre ellos.

No hubo diferencias significativas en la actividad antioxidante entre todas las muestras estudiadas. Como se muestra en la Fig. 1, las plantas tratadas con NaCl+MeJa mostraron la capacidad de eliminación de DPPH más potente con 117,78±1,08 mg AAE kg⁻¹ FW, respecto a los tratamientos con MeJa (108,80±1,77 mg AAE kg⁻¹ FW) y NaCl (109,92±5,84 mg AAE kg⁻¹ FW) y los controles 1 y 2 con un valor de 113,63±7,16 mg AAE kg⁻¹ FW y 110,84±5,46 mg AAE kg⁻¹ FW, respectivamente. Estos resultados fueron consistentes el contenido de flavonoides, siendo el tratamiento con NaCl+MeJa el que muestra mayores valores.

La Tabla 1 muestra que los pesos frescos y secos se vieron afectados por los diferentes tratamientos, siendo el control 1 el que proporcionó plantas con mayor peso. Esta observación indica que los tratamientos utilizados inhibieron el crecimiento de las plantas.

La inhibición del crecimiento debido al estrés por salinidad en las plantas está bien documentada y está relacionada con varias limitaciones, de las cuales el estrés osmótico es el más influyente (10). De manera similar a los estudios anteriores, el tratamiento con MeJa contrarrestó los efectos negativos del estrés por NaCl en el crecimiento de las plantas (11). Este efecto contrario puede explicarse por la capacidad de MeJa para mejorar significativamente la tasa de respiración y aumentar el punto de compensación de CO₂ en las plantas (12).

4. CONCLUSIONES

El MeJa alivia la disminución del crecimiento que produce la salinidad sin disminuir la capacidad antioxidante y el contenido en fenoles de la misma, mientras aumenta el contenido en flavonoides respecto a los controles, con lo cual se perfila como un tratamiento óptimo en forma de spray foliar en esta planta para su cultivo en condiciones de estrés salino.

5. REFERENCIAS

1. Cros V, Martínez-Sánchez JJ, Franco JA. Good yields of common purslane with a high fatty acid content can be obtained in a peat-based floating system. *Horttechnology*. 2007;17(1):14–20.
2. Munns R, Tester M. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annu Rev Plant Biol*. 2008;59(1):651–81.
3. Munns R. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell Environ*. 2002;25(2):239–50.
5. Sarrou E, Siomos AS, Riccadona S, Aktsoğlu DC, Tsouvaltzi P, Angeli A, et al. Improvement of sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) nutritional value through iodine biofortification in a hydroponic floating system. *Food Chem*. 2019;(295):150–9.
6. Brand-Williams W, Cuvelier M-E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol*. 1995;28(1):25–30.
7. Pérez-Tortosa V, López-Orenes A, Martínez-Pérez A, Ferrer MA, Calderón AA. Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. *Food Chem*. 2012;130(2):362–9.
8. Everette JD, Bryant QM, Green AM, Abbey YA, Wangila GW, Walker RB. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin–Ciocalteu reagent. *J Agric Food Chem*. 2010;58(14):8139–44.
9. Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Faso honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem*. 2005;91(3):571–7.
10. Zhao C, Zhang H, Song C, Zhu JK, Shabala S. Mechanisms of Plant Responses and Adaptation to Soil Salinity. *Innov*. 2020;
11. Yoon JY, Hamayun M, Lee SK, Lee IJ. Methyl jasmonate alleviated salinity stress in soybean. *J Crop Sci Biotechnol*.

2009; 12 (2): 63-68.

12. Ahmadi FI, Karimi K, Struik PC. Effect of exogenous application of methyl jasmonate on physiological and biochemical characteristics of *Brassica napus* L. cv. Talaye under salinity stress. South African J Bot. 2018;115:5-11.

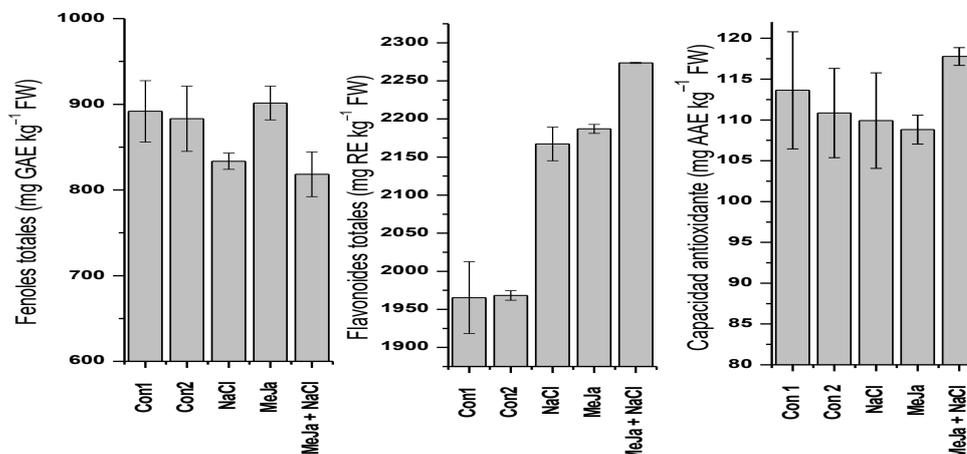


Figura 1. Contenido en fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante plantas de *C. maritimum*. Con1: plantas sin tratamiento; Con2: plantas tratadas foliarmente con Tween 20 (1 ml L⁻¹) + Etanol 0,2 %; NaCl: plantas cultivadas en NaCl 150 mM; MeJa: plantas tratadas con MeJa 0,5 mM diluido en Tween 20 (1 mL L⁻¹) + Etanol 0,2 %; NaCl+MeJa: plantas cultivadas en NaCl 150 mM y tratadas con MeJa 0,5 mM diluido en Tween 20 (1 mL L⁻¹) + Etanol 0,2 %. Los valores representan la media±SD (n=10).

Tabla 1. Determinación de peso fresco, peso seco de muestras de *C. maritimum* con diferentes tratamientos. Con1: plantas sin tratamiento; Con2: plantas tratadas foliarmente con Tween 20 (1 ml L⁻¹) + Etanol 0,2 %; NaCl: plantas cultivadas en NaCl 150 mM; MeJa: plantas tratadas con MeJa 0,5 mM diluido en Tween 20 (1 mL L⁻¹) + Etanol 0,2 %; NaCl+MeJa: plantas cultivadas en NaCl 150 mM y tratadas con MeJa 0,5 mM diluido en Tween 20 (1 mL L⁻¹) + Etanol 0,2 %. Los valores representan la media±SD (n=10).

Muestra	Peso fresco (g)	Peso seco (mg)
Con1	11,51±0,77a*	1,33±0,09a
Con2	8,92±0,81b*	1,03±0,09b
MeJa	7,21±0,43b	0,83±0,05b
NaCl	5,25±0,49c*	0,60±0,06c
NaCl+ MeJa	7,94±0,55b	0,91±0,06b

*Letras diferentes indican diferencias significativas P<0,05.

Effect of UV-B light on hypocotyl growth during red cabbage seed germination

Efecto de la iluminación UV-B en el crecimiento del hipocótilo durante la germinación de semillas de col roja

N. Castillejo^{1,2*}, L. Martínez-Zamora^{1,2}, P.A. Gómez², F. Artés^{1,2}, F. Artés-Hernández^{1,2}

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

²Unidad de Calidad Alimentaria y Salud, Instituto de Biotecnología Vegetal, Edificio I+D+I, UPCT, Campus Muralla del Mar, UPCT, 30202 Cartagena. Spain.

*noelia.castillejo@upct.es

Abstract

Brassica sprouts are a source rich in nutritional and bioactive compounds such as polyphenols, flavonoids, antioxidants and glucosinolates. In addition, the application of UV-B to fruit and vegetables increases phytochemical biosynthesis. The aim of this work was to determine whether different UV-B stresses during red cabbage seeds germination influenced the development. The UV-B light was applied in 4 equal doses on days 3, 5, 7 and 10 of germination at 20 °C, with a total dose of 0, 5, 10 and 15 kJ m⁻². The length of the hypocotyl of the sprouts was determined, as well as their growth rate. Sprouts under UV-B had a longer hypocotyl length and 10 kJ m⁻² induced a faster growth. Our results show that controlled and discontinuously applied doses of UV-B can promote sprout growth.

Keywords: *Brassica oleracea* var. *capita*; sprouts; cruciferous; stress.

Resumen

Los germinados de Brassicas poseen un elevado contenido de compuestos nutricionales y bioactivos tales como polifenoles, flavonoides, antioxidantes y glucosinolatos. La aplicación de luz UV-B a frutas y hortalizas estimula la biosíntesis de fitoquímicos. Por ello el objetivo fue determinar si diferentes estreses con UV-B durante la germinación de semillas de col roja perjudicaban su desarrollo. La luz UV-B se aplicó en 4 dosis iguales en los días 3, 5, 7 y 10 de germinación a 20 °C que sumaron un total de 0, 5, 10 y 15 kJ m⁻². Se determinó la longitud del hipocótilo de los germinados y su velocidad de crecimiento. Los germinados bajo UV-B tuvieron una mayor longitud del hipocótilo y bajo 10 kJ m⁻² crecieron más rápidos. Así pues, dosis controladas y aplicadas de forma discontinua pueden favorecer el crecimiento de los germinados.

Palabras clave: *Brassica oleracea* var. *capita*; germinados; crucíferas; estrés.

1. INTRODUCCIÓN

La col roja es una *Brassica* consumida a nivel mundial. Numerosos estudios epidemiológicos muestran que hay una asociación inversa entre el consumo de hortalizas del género *Brassica* y el riesgo de padecer cáncer y enfermedades cardiovasculares (1). Los germinados son alimentos funcionales debido a sus altas concentraciones de compuestos bioactivos y nutricionales comparado con la planta adulta (2).

Un estrés lumínico con luz ultravioleta-B (UV-B) causa respuestas fisiológicas y metabólicas en plantas incluido la biosíntesis de compuestos antioxidantes como metabolitos secundarios (3).

La luz UV-B es una herramienta para inducir la biosíntesis y acumulación de flavonoides y glucosinolatos (4).

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de diferentes dosis de luz UV-B durante el crecimiento de germinados de col roja durante 10 días a 20 °C sobre la longitud del hipocótilo y la velocidad de crecimiento.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Las semillas de col roja (*Brassica oleracea capita rubra*), compradas en Intersemillas S.A., (Valencia, Spain) se germinaron en bandejas con papel de filtro. En cada bandeja se dispusieron 2 g de semillas, constituyendo cada bandeja una repetición. Las condiciones de germinación fueron 10 días en oscuridad a 20 °C. Durante la germinación, se aplicaron tres tratamientos de UV-B (1,25, 2,50 y 3,75 kJ/m²) en 4 días (a los 3, 5, 7 y 10 días). Tras la germinación, las dosis de UV-B totales recibidas fueron 5, 10 y 15 kJ/m² (UVB5, UVB10 y UVB15, respectivamente). El control (CTRL) se germinó sin aplicación de UV-B.

2.1 Longitud del hipocótilo

La longitud del hipocótilo se midió en cada día de salida (3, 5, 7 y 10 días) y para cada tratamiento mediante el programa ImageJ. Se tomaron 30 germinados por bandeja y los valores se expresaron en cm.

2.2 Velocidad de crecimiento

Las ecuaciones de la velocidad de crecimiento para cada tratamiento se determinaron mediante una regresión exponencial de los valores obtenidos mediante el programa ImageJ. Además, se determinó la fase exponencial de la curva de crecimiento mediante una regresión lineal.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La velocidad de crecimiento de los germinados de col bajo los tratamientos UVB5 y UVB10 fue mayor respecto al CTRL. Tras 5 y 7 días de germinación se observó un incremento del hipocótilo del 88 % para los germinados bajo UVB10 respecto a los germinados CTRL. Además, la longitud del hipocótilo de los germinados bajo las tres dosis de UV-B fue mayor que en el CTRL. Las curvas de crecimiento de los germinados de col roja bajo los diferentes tratamientos estudiados tuvieron un buen ajuste ($R^2 > 0,9$) con una regresión exponencial (Fig. 1).

Las curvas de crecimiento de los germinados estresados con UV-B presentaron una mayor pendiente en su fase exponencial (Fig. 2). Los germinados bajo UVB10 presentaron la mayor pendiente (0,76), mientras que el CTRL presentó la menor pendiente (0,53).

Está descrito que la luz UV-B puede causar respuestas en el desarrollo morfológico de las plantas durante su crecimiento, como la inhibición (5). Sin embargo, en base a los resultados obtenidos, se plantea que, en función de las dosis y tiempo, entre otros factores, es posible que el efecto pueda ser beneficioso induciendo un estrés abiótico que pueda reportar un mayor crecimiento de los germinados con respecto al CTRL.

4. CONCLUSIONES

La aplicación de radiación UV-B durante el crecimiento de los germinados de col incrementó la longitud del hipocótilo y reportó una mayor velocidad de crecimiento. La dosis de 10 kJ/m² UV-B obtuvo los mejores resultados de crecimiento del hipocótilo.

5. AGRADECIMIENTOS

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

6. REFERENCIAS

1. Li G, Quiros CF. Genetic analysis, expression and molecular characterization of BoGSL-ELONG, a major gene involved in the aliphatic glucosinolate pathway of Brassica species. *Genetics*. 2002;162(4):1937–43.
2. Kwack Y, Kim KK, Hwang H, Chun C. Growth and quality of sprouts of six vegetables cultivated under different light intensity and quality. *Hortic Environ Biotechnol*. 2015;
3. Moreira-Rodríguez M, Nair V, Benavides J, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velázquez DA. UVA, UVB light, and methyl jasmonate, alone or combined, redirect the biosynthesis of glucosinolates, phenolics, carotenoids, and chlorophylls in broccoli sprouts. *Int J Mol Sci*. 2017;18(11):1–20.
4. Mewis I, Schreiner M, Nguyen CN, Krumbein A, Ulrichs C, Lohse M, et al. UV-B irradiation changes specifically the secondary metabolite profile in broccoli sprouts: Induced signaling overlaps with defense response to biotic stressors. *Plant Cell Physiol*. 2012;53(9):1546–60.
5. Yadav A, Singh D, Lingwan M, Yadukrishnan P, Masakapalli SK, Datta S. Light signaling and UV-B-mediated plant growth regulation. *J Integr Plant Biol*. 2020;62(9):1270–92.

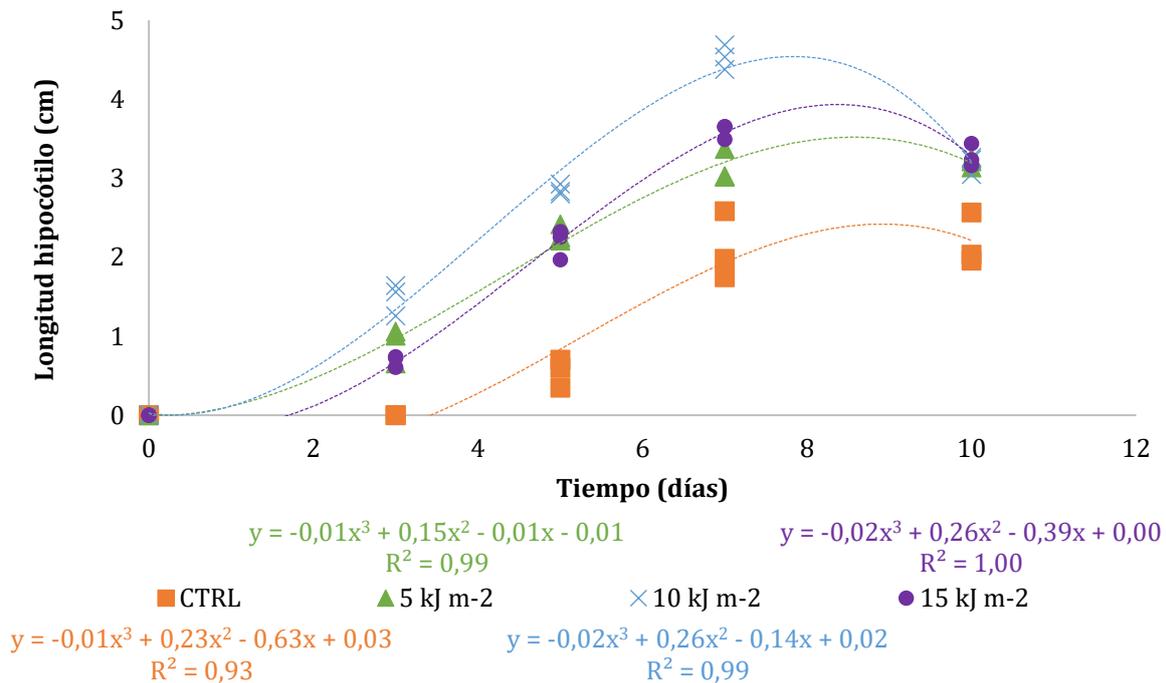


Figura 1. Curva de crecimiento del hipocótilo de los germinados de col roja a los 3, 5, 7 y 10 días tras la aplicación de diferentes dosis de UV-B (5, 10 y 15 kJ m⁻²) y un control sin radiación (CTRL).

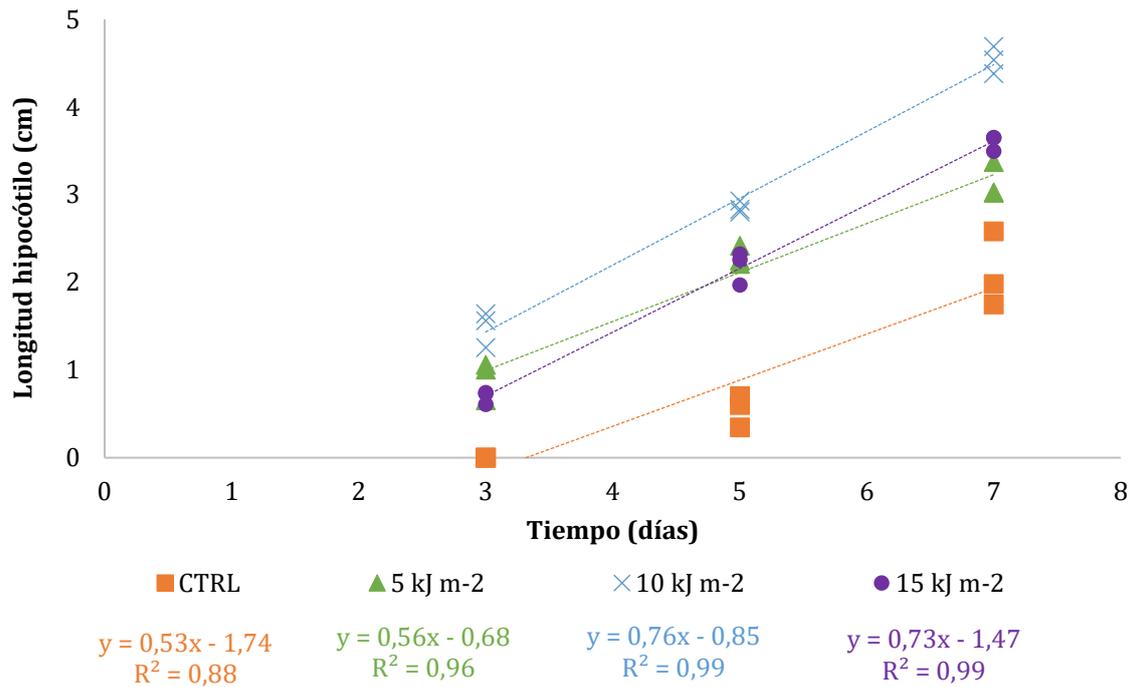


Figura 2. Pendiente de la fase exponencial de la curva de crecimiento del hipocótilo de los germinados de col roja a los 3, 5, 7 y 10 días tras la aplicación de diferentes dosis de UV-B (5, 10 y 15 kJ m⁻²) y un control sin radiación (CTRL).

Inheritance of resistance to acrinathrin in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae)

Herencia de la resistencia al acrinatrín en *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae)

J. Abellán*, V. Quinto, E. Fernández, C. Grávalos, D. Cifuentes, P. Bielza

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

*jaimeabellan@hotmail.com

Abstract

The genetic basis of acrinathrin resistance was investigated in WFT. The resistant strain, selected in the laboratory for acrinathrin resistance from a pool of thrips populations collected in Almeria (south-eastern Spain), showed a high resistance to acrinathrin (43-fold based on LC₅₀ values) compared with the laboratory susceptible strain. Mortality data from reciprocal crosses of resistant and susceptible thrips indicated that resistance was autosomal and not influenced by maternal effects. Analysis of probit lines from the parental strains and reciprocal crosses showed that resistance was expressed as a codominant trait.

Keywords: thrips; insecticide resistance; genetic; pyrethroid.

Resumen

Se investigó la base genética de la resistencia al acrinatrín para *Frankliniella occidentalis*. La población resistente, seleccionada en el laboratorio para la resistencia a acrinatrín, de un conjunto de poblaciones de trips recogidas en Almería (sureste de España), mostró una gran resistencia al acrinatrín (43 veces superior a la CL₅₀) comparada con la población susceptible de laboratorio. Los datos de mortalidad de cruces recíprocos de trips resistentes y susceptibles indicaron que la resistencia era autosomal y no estaba influenciada por efectos maternos. El análisis de las líneas probit de las poblaciones parentales y los cruces recíprocos mostró que la resistencia se expresaba como un rasgo codominante.

Palabras clave: trips; resistencia insecticida; genética; piretroide.

1. INTRODUCCIÓN

El trips occidental de las flores (TOF), *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae), es una plaga muy importante en el mundo debido a los daños económicos que ocasiona. El uso indiscriminado de insecticidas, el rápido desarrollo de generación de *F. occidentalis*, su gran fecundidad y su sistema de reproducción haplodiploide, en el cual los genes de resistencia están directamente expuestos a la selección a través del tratamiento insecticida, han llevado al desarrollo de resistencia a la mayoría de grupos de insecticidas; organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides y spinosines. Un trabajo previo, mostró, que el principal mecanismo de resistencia al formetanato, metiocarb y acrinatrín en *F. occidentalis* es metabólico. Y otro estudio, que la detoxificación metabólica no era la responsable de la resistencia a spinosad. Estos resultados explican la carencia de resistencia cruzada del spinosad con el acrinatrín, el formetanato y metiocarb. Todos estos resultados sugieren que el mecanismo de

resistencia hacia el spinosad para el TOF sea de alteración del punto de acción. Otro estudio sugirió, que la resistencia al spinosad es autosomal y no está influida por efectos maternos, a la vez que está expresada en un rasgo casi completamente recesivo, probablemente controlado por un locus (1-4). El éxito de las estrategias de resistencia a insecticidas depende de una serie de factores, que incluyen el modo de herencia de la resistencia. Un mejor conocimiento de la genética de la resistencia ayudará a diseñar y aplicar programas de gestión de la resistencia frente al TOF. El presente estudio, se inició para definir la naturaleza de la resistencia al acrinatrín de un modo más exhaustivo, examinando su herencia. Los patrones de herencia se examinaron para determinar el grado de dominancia de la resistencia, así como posibles nexos de sexo y la naturaleza monogénica o poligénica de la resistencia.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Insectos

La población susceptible de *F. occidentalis* se recogió en 2001, de cultivos de pimiento en Murcia en control integrado. A principios de 2003, se recogieron seis poblaciones de *F. occidentalis* en Almería de varios invernaderos de pimiento bajo control químico, que posteriormente se criaron en laboratorio. Los supervivientes de concentraciones por encima de la CL50 se seleccionaron y se criaron. Esta población seleccionada para la resistencia al acrinatrín (AR) se mantuvo en el laboratorio, y la resistencia se mantuvo mediante selección por presión periódica.

2.2 Insecticida

Para los bioensayos se utilizó acrinatrín comercial de 75 g L⁻¹ EC (Rufast, Agrodan).

2.3 Bioensayos

Los bioensayos se realizaron con adultos hembra de TOF, se sumergieron trozos de hoja de pimiento dulce (30 x 5 mm) durante 10 s en las disoluciones seleccionadas y entonces se dejaron secar durante 1-2 h a temperatura ambiente. Se sumergieron las secciones de hoja de control en agua destilada con Tween 20 (1 g L⁻¹). Las secciones de hojas se colocaron entonces a viales de plástico individuales (5 mL). Se pusieron 10 trips hembra adultos en cada vial. Los viales se cerraron con un trozo de papel de celulosa encima del tapón para prevenir condensaciones de agua y se mantuvieron en posición vertical a 25±2 °C y un fotoperiodo 16:8 h luz: oscuridad. Se ensayaron un total de 5-9 concentraciones más un control (sin insecticida) para cada población en tres repeticiones que contenían 10 trips adultos por repetición. Las concentraciones se eligieron para obtener un rango de mortalidad del 0-100 %. El ensayo se evaluó después de 24 h. Los individuos que no se movían, se anotaban como muertos.

2.4 Cruces genéticos

Para determinar la base genética de la resistencia se realizaron varios cruces entre la población resistente (AR) y la susceptible (S). La respuesta de F1 y la progenie del primer cruce se determinó al acrinatrín. Se cruzó recíprocamente en masa entre AR y S, obteniendo la progenie F1. Está primera progenie se obtuvo de los cruces en masa entre las hembras vírgenes de F1 y machos AR, y hembras vírgenes F1 y machos S. Para obtener hembras vírgenes se usaron 150 larvas "II" de cada población y se criaron en laboratorio. Los adultos emergentes se sexaron; los machos se descartaron y las hembras vírgenes se vuelven a criar para su cruce masivo. Los machos usados en los cruces masivos se recogieron de la cría de cada población. Para los cruces masivos se emparejaron hembras vírgenes AR con machos S, y hembras vírgenes S con machos AR. Se usaron al menos 100 hembras vírgenes y 200 machos en cada cruce masivo. Estos cruces proporcionaron retoños suficientes para hacer ensayos y calcular los valores de la CL50 para múltiples concentraciones. TOF tiene un mecanismo de reproducción arrenotóquia

(haplodiploide). Los machos resultan de los huevos haploides sin fecundar, y las hembras de los huevos diploides fecundados. Es por esto por lo que se usaron solo hembras para los bioensayos.

2.5 Análisis de la herencia

Se calcularon los datos a partir de la mortalidad observada en el control y analizados usando el programa Polo PC para el análisis probit. Se calculó la concentración para una mortalidad del 50 % (CL50), y cualquier pareja de valores comparados se consideró significativamente si sus respectivos intervalos de confianza (IC) al 95 % no se solapaban. También se determinaron los factores de resistencia (FR) dividiendo los valores de CL para la población resistente por los valores correspondiente de CL para la población susceptible para cada insecticida.

2.6 Análisis de datos de mortalidad

Se utilizaron los datos de mortalidad de cada cruce parental recíproco, para determinar si la resistencia era autosomal, enlazada al sexo o influenciada por efectos maternos. El grado de dominancia para la CL50 (DCL) se calculó como se describe en [5]; $DCL = (\log CLRS - \log CLS) / (\log CLR - \log CLS)$. Donde CLPR, CLS y CLR son los valores de CL50 para los individuos híbridos (F1), susceptibles (S) y resistentes (AR), respectivamente. DCL varía de 0 a 1 (0 = recesión completa y 1 = dominancia completa). La dominancia efectiva (DNM) se calculó a partir de los valores de mortalidad a una determinada concentración como sigue; $DNM = (NMRS - NMSS) / (NMRR - NMSS)$. Donde NMRR, NMRS y NMSS son la mortalidad a una determinada concentración de acrinatrín para la progenie AR, F1 y S, respectivamente. Los valores de DNM van de 0 (resistencia completamente recesiva) a 1 (resistencia completamente dominante).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Toxicidad del acrinatrín

El valor de la CL50 para la población susceptible (S), de TOF fue de 53,4 mg L⁻¹ de acrinatrín (Tabla 1, Fig. 1). La población seleccionada para resistencia al acrinatrín (AR) se mostró muy tolerante al acrinatrín (RF = 43), con un valor de CL50 de 2305 mg L⁻¹ (Tabla 1, Fig. 1).

3.1 Enlace por sexo, efectos maternos y dominancia

Los valores de la CL50 para la progenie F1 de hembra S x macho AR y hembra AR x macho S fueron 370,1 y 344,5 mg L⁻¹ de acrinatrín, respectivamente (Tabla 1, Fig. 1). La hipótesis nula de igualdad entre las dos líneas de regresión probit del recíproco F1 no se rechazaron al nivel significativo del 5 % ($\chi^2=0,54$, $df=2$, $P=0,76$). Esta igualdad sugirió que el enlace por sexo de la resistencia no ocurrió y que la base genética de la resistencia al acrinatrín era herencia autosomal y que no estaba influenciada por efectos maternos. Así mismo estaba expresada como un rasgo codominante, probablemente controlado por un locus. El grado de dominancia de los alelos de resistencia puede contribuir a la propagación de la resistencia. La dominancia no es una propiedad intrínseca de un alelo. Su expresión depende normalmente de la dosis aplicada, llevándonos al concepto de dominancia efectiva (DNM). En el presente estudio el grado de dominancia (DCL) basado en la CL50 de las progenes F1 era 0,50, lo que indicaba un rasgo codominante. Sin embargo, la dominancia efectiva, $DNM = 0,93$, indica una resistencia dominante a la dosis de campo recomendada de 60 mg L⁻¹. Sin embargo, el sistema de reproducción haplodiploide de TOF, puede acelerar el desarrollo de resistencia, independientemente de la dominancia intrínseca o del carácter recesivo de los alelos, como genes resistentes que están expuestos a la selección en machos homocigotos.

4. CONCLUSIONES

Los datos presentes indican que la base genética de la resistencia al acrinatrín era herencia autosomal, no influenciada por efectos maternos y expresada como un rango codominante, probablemente controlado por un locus.

5. REFERENCIAS

1. Bielza P, Quinto V, Fernández E, Grávalos C and Contreras J, Genetics of spinosad resistance in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *J Econ Entomol* 2007; 100:916–920
2. Bielza P, Quinto V, Contreras J, Torné M, Martín A and Espinosa PJ, Resistance to spinosad in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), in greenhouses of south-eastern Spain. *Pest Manag Sci* 2007; 63:682–687
3. Espinosa PJ, Contreras J, Quinto V, Grávalos C, Fernández E and Bielza P, Metabolic mechanisms of insecticide resistance in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Pest Manag Sci* 2005; 61:1009–1015
4. Bielza P, Espinosa PJ, Quinto V, Abellán J and Contreras J, Synergism studies with binary mixtures of pyrethroid, carbamate and organophosphate insecticides on *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Pest Manag Sci* 2007; 63:84–89
5. Bourguet D, Genissel A and Raymond M, Insecticide resistance and dominance levels. *J Econ Entomol* 2000;93:1588–1595.

Tabla 1. Análisis de la regresión probit de la mortalidad de acrinatrín en poblaciones resistentes (AR) y susceptibles (S) de *Frankliniella occidentalis* y cruces seleccionados.

Población	n	Pendiente ±SE	CL50 (mg L ⁻¹) (95 % CL)	χ ² (df)	DCL ^a
S	210	1,96±0,27	53,4 (37,1 - 75,9)	12,9 (16)	
AR	150	2,58±0,78	2305 (1244 - 3737)	5,7 (10)	0,5 (0,2 - 1,0)
F1 (S hembra x AR macho)	180	1,45±0,19	370,1 (245,3 - 572,5)	11,0 (13)	1,0 (0,4 - 2,1)
F1 (S macho x AR hembra)	180	1,65±0,22	344,5 (234,6 - 510,7)	10,6 (13)	1,0 (0,4 - 2,8)
F1 Seleccionado	330	1,54±0,14	356,2 (269,8 - 474,3)	22,1 (28)	
F1 x S	150	1,17±0,22	52,1 (27,3 - 86,0)	7,9 (10)	9,2 (4,2 - 20,2)
F1 x AR	180	1,20±0,42	1000,5 (276,5 - 1953,7)	7,1 (13)	3,5 (1,6 - 7,5)

^a Grado de dominancia para la CL50: $DCL = (\log CLRS - \log CLS) / (\log CLR - \log CLS)$

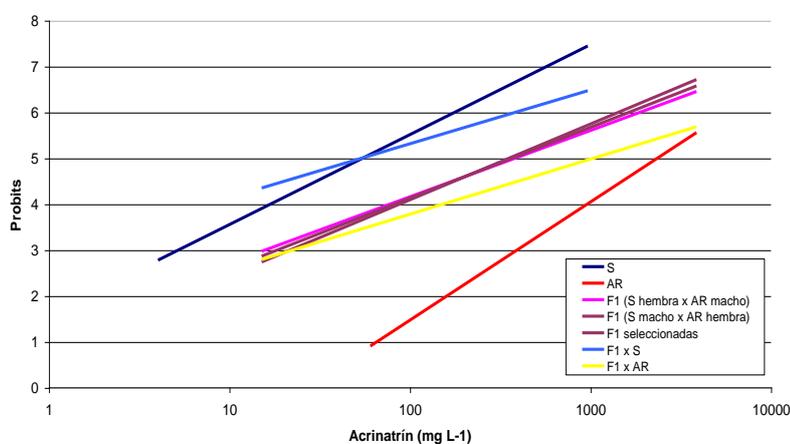


Figura 1. Logaritmo de las dosis de las líneas probit de acrinatrín para la población susceptible (S) y resistente (AR) de TOF y cruces seleccionados.

Importance of packaging for the application of the Circular Economy in the Agri-Food Industry

Importancia del envasado para aplicación de la Economía Circular en la Industria Agroalimentaria

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

Departamento de la Economía de la Empresa, ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30201 Cartagena. Spain.

*chemadonate@gmail.com

Abstract

There are many interests created with the linear production model, the survival of society as we know it, requires an effort by everyone to change to a more sustainable circular production model with the planet, to be more friendly to the environment. By implementing the circular model we will reuse resources that were previously treated as waste and it is about relearning what we have learned, respecting what we did not value, reinventing ourselves, contributing to well-being, reducing consumption and valuing what we have to feel better and finally to recycle with information and common sense. The results obtained have been crucial to know what consumers' concerns are regarding health related to food, information on food labeling, food waste, and recycling.

Keywords: sustainability; food, use; by-products; environment.

Resumen

Son muchos los intereses creados con el modelo lineal de producción, la supervivencia de la sociedad tal y como la conocemos, requiere un esfuerzo de todos para cambiar a un modelo de producción circular más sostenible con el planeta, ser más amigo del medio ambiente. Al implantar el modelo circular reutilizaremos recursos que antes eran tratados como residuos pero que ahora son recursos, se trata de reaprender lo aprendido, a respetar lo que no le dábamos valor, a reinventarnos, a contribuir con el bienestar, a reducir el consumo y a valorar lo que tenemos para sentirnos mejor y finalmente a reciclar con información y sentido común. Los resultados obtenidos han sido cruciales para conocer cuál es la preocupación de los consumidores en materia de salud relacionada con la alimentación, información en el etiquetado de alimentos, desperdicio alimentario, y reciclaje.

Palabras clave: sostenibilidad; alimentación; aprovechamiento; subproductos; medio ambiente.

1. INTRODUCCIÓN

El sector agroalimentario se encuentra dentro de las actividades económicas más importantes en la economía española, y durante este estado de alarma por el COVID-19 ha sido reconocida como actividad esencial, representando el 16 % del total de la fabricación. En cuanto al consumo de alimentos por persona y año, en 2017 fueron de 751,30 kg lo que representó unos 102 mil millones de euros, representando el 2,7 % del PIB nacional. Por otro lado, la cantidad de alimentos desperdiciada a nivel mundial cada año han sido de 1.300 millones de t, y 89 millones en la Unión Europea, y de 8 millones en España. Se espera un aumento en los próximos años (1). El desperdicio alimentario, conlleva varios problemas, por un lado, el carácter ético y nutricional, relacionado con todas aquellas personas a las que se dejan de alimentar, y, por otro lado, el

problema medioambiental que genera, no solo desechas un alimento sino todos los recursos utilizados, trabajo, tiempo, agua y energía para obtener ese alimento y procesarlo, y al mismo tiempo generas un residuo difícil y caro de gestionar (2).

La economía circular se basa en el hecho de que no existe residuo en la naturaleza, donde el residuo de uno es el alimento o el factor de producción de otro (3).

La economía circular también debe aplicarse en toda la cadena agroalimentaria, comenzando en el cultivo a pie de campo, pasando de la industria alimentaria a la tienda especializada o supermercados, y terminando en el consumidor final. Pero antes de esto hay un gran trabajo a realizar (4), la producción lineal que tanto ha perjudicado a nuestro ecosistema y que tanto ha beneficiado a la economía de las grandes multinacionales, tiene fecha de caducidad, pero hay que comenzar desde el inicio, y se trata del rediseño de productos, ésta es quizás de las tareas más importantes, es en ella donde se puede llevar a cabo una innovación del producto, una reformulación, darle un segundo uso, la búsqueda de nuevos materiales o simplemente hacer productos que se transformen en otros al final de su vida útil, y lo que no sirva a uno, sea materia prima para otro, produciendo productos con un valor económico difícil de desechar (5).

En la industria de la alimentación nos encontramos varios problemas añadidos, el despilfarro alimentario, el desecho alimentario, que generan desechos orgánicos, la cantidad de basura generada debido los plásticos de un solo uso que infectan nuestros mares (4).

Es en el etiquetado de alimentos donde podemos hacer una gran labor a la hora de establecer patrones, que desde la industria existan unos códigos medioambientales y saludables, con una implicación de las administraciones públicas, y que finalmente, seamos todos los beneficiados de estos cambios, siendo el más vulnerable el consumidor final (6). Estos cambios, también, se deben de incorporar a la hora de tratar de la salud del consumidor, cuando hablamos de obesidad infantil, alergias alimentarias, intolerancias alimentarias, que tanto están preocupando a las autoridades sanitarias y están costando a los gobiernos, debido a los aumentos del número de personas con estas patologías (7).

Los objetivos que se persiguen en esta investigación son:

1. Comprobar la falta de información del consumidor en materia de reciclaje.
2. Ver la aportación que le puede dar el etiquetado en materia de economía circular.
3. Analizar las actitudes del consumidor para mejorar la situación actual frente a los desechos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se han realizado 520 encuestas, compuesta por 27 preguntas, tratando aspectos tan importantes y que afectan a la economía circular, como el tipo de consumo, medioambiente, desperdicio alimentario, generación de residuos, y su reciclaje. La batería de preguntas ha tratado de recabar información sobre:

1. Preocupación del consumidor por la salud y si el consumo de alimentos lo relaciona con su salud;
2. Hábitos de compra, lugar de compra, frecuencia de esta compra, tipologías de alimentos que consume, si las frutas y verduras frescas predominan en su carro de la compra o son alimentos procesados o ultra-procesados los que consumen;
3. Inquietud por analizar el contenido de los alimentos procesados a través de la información contenida en las etiquetas, como fecha de caducidad, calorías y grasas que aportan, conocer si su origen es animal o vegetal, si son saturadas o trans, y especialmente si esta grasa es de palma, azúcar añadida, la naturaleza de los aditivos, conservantes y colorantes;

4. Detectar la preocupación del medio ambiente a través de su preocupación por la procedencia y naturaleza del plástico con el que se elabora envase, su posterior uso y reciclaje;
5. El procedimiento de reciclado en el hogar.

Por tanto, el objetivo principal del cuestionario planteado es la medida de actitudes, opiniones y comportamientos específicos sobre la influencia de las etiquetas alimentarios tienen para el consumidor, y su aplicación en la economía circular. La recogida de la información se ha completado con datos socioeconómicos.

Una vez realizado el pre-test con 11 preguntas abiertas sobre reciclaje y las modificaciones necesarias en algunos ítems, se diseñó el cuestionario definitivo compuesto por 27 preguntas estructuradas en los 5 bloques generales señalados. Para agilizar el proceso de toma de datos a través de las encuestas, el formato del cuestionario fue con todas las preguntas cerradas.

En cumplimiento de la legislación vigente de protección de datos, la encuesta se ha lanzado a través de las redes sociales, por correo electrónico, y de forma directa, preguntado al ciudadano en las puertas de supermercados e hipermercados. La encuesta fue traducida al inglés y se obtuvieron 50 respuestas de contactos de nacionalidades como Estados Unidos y Reino Unido.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un 64 % de los encuestados son mujeres y 36 % hombres, la edad media fue de 19 años a más de 60, concentrándose el mayor grupo en la franja comprendida de los 31 a 45 años con un 37,86 % de los encuestados.

En cuanto a la planificación de las compras, el 37,2 % realiza una planificación de las compras, pero siempre compra cosas que no ha planificado, el 15 % se ciñe a los productos que ha planificado y el 14,15 % planifica en función de los productos que van a caducar en su despensa. El 15 % no planifica a la hora de realizar la compra. También, cabe añadir que el 26 % afirma comprar alimentos que no necesita.

Hay un alto porcentaje de personas preocupadas por consumir productos que hayan sido producidos y comercializado cerca de su hogar, por la confianza que le proporciona el consumo de un producto fresco y sin tratamiento agresivos, esta situación le preocupa realmente a un 56,12 % de los encuestados, dándole especial importancia a que dicha información aparezca en la etiqueta de los alimentos, también tiene una especial importancia estar informado de donde ha sido envasado el alimento con un 46,93 %. Referente al envase y su reciclaje, parece que va llamando la atención del consumidor, ya que el porcentaje de encuestados que desean conocer la utilidad que se le puede dar al envase una vez consumido el producto es de 51,53 %.

El interés por evitar el desperdicio alimentario también es evidente en las respuestas obtenidas en el cuestionario, preocupación por tirar una comida ya preparada es manifestada por un 90,30 % de los encuestados, un porcentaje realmente elevado. Sin embargo, se reconoce, con un 62,24 %, que el desperdicio está relacionado con la mala planificación a la hora de hacer la compra. Respecto al reciclado solo el 47,34 % de los encuestados compran envases que se le pueda dar un segundo uso, frente al 73,55 % que si reutiliza el vidrio en su hogar.

No nos sorprende la mala información que recibe el consumidor frente al reciclado, siendo un 56,45 % manifiestan desconocer donde se depositan los metales, algo más de la cuarta parte de la población encuestada, un 28,22 %, no sabe donde depositar los juguetes de plástico, esta situación refleja el alto grado de sensibilización del ciudadano por el medio ambiente, ya que un 82,30 % demandan más información en materia de reciclado.

Como se observa, esta situación va calando y actualmente hay cierta inquietud en conocer más sobre la composición de los alimentos que se consumen y de la generación de los residuos

que se producen, el 74,16 % precisa saber los tipos de plástico utilizados en cada producto y que esta información quede reflejada en la etiqueta para después poder proceder a un reciclaje adecuado como indica, el 80,38 % de los encuestados, al demandar ideas para un segundo uso de dicho envase, destino y, evidentemente, formas y lugares de reciclarlo.

4. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos, vemos una clara deficiencia en cuanto a la información en materia de los envases se refiere, la concienciación social es alta, pero pocos los resultados obtenidos en materia de reciclaje, es necesario una mayor implicación de las administraciones y empresas para realizar las cosas de diferente manera, el consumidor conoce su responsabilidad con el medio ambiente, pero le faltan los medios para llevarlo a cabo.

Podemos concluir:

- Que el consumidor final sabe la implicación que tiene y la responsabilidad de las empresas, que su responsabilidad no disminuye con los medios que posee, pero termina en frustración al ver los pocos medios con que se dispone.
- Que la falta de información es evidente, se demanda, pero no se prospera en materia de reciclado.
- El concepto de economía circular en el sector alimentario tiene mucho potencial, y es fácil de aplicar, teniendo los medios apropiados, que aún no se dispone de ellos.
- Que el etiquetado de alimentos es un medio en el que el consumidor reclama más información, más claridad y transparencia de lo que tienen actualmente, de ello depende el cuidado de su salud y el medio ambiente.

5. AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas que me han dedicado el tiempo a responder a la encuesta.

6. REFERENCIAS

1. Annunziata A, Vecchio R. Functional foods development in the European market: A consumer perspective. *J Funct Foods*. 2011;3(3):223–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2011.03.011>
2. Dev NK, Shankar R, Qaiser FH. Industry 4.0 and circular economy: Operational excellence for sustainable reverse supply chain performance. *Resour Conserv Recycl*. 2020;1:153.
3. Webster K. What might we say about a circular economy? Some temptations to avoid if possible. *World Futur J Gen Evol*. 2013;69(7–8):542–54.
4. Europa. Comunicación de la Comisión al Parlamento europeo, al Consejo, al Comité económico y social europeo y al Comité de las regiones - Cerrar el círculo: un plan de acción de la UE para la economía circular. *D Of las Comunidades Eur*. 2015;614:1–24.
5. Geissdoerfer M, Savaget P, Bocken NMP, Hultink EJ. The Circular Economy – A new sustainability paradigm?. *J Clean Prod*. 2017;143:757–68.
6. FAO. The Chilean food labelling law [Internet]. 2018. Available from: <http://www.fao.org/publications/es>
7. Menghi A. Alergias e intolerancias alimentarias. *Inven Rev Investig académica*. 2002;(8):123–32.

ORAL SESSION III:
Agrifood Biotechnology
and Agroforestry
Engineering

Influence of edaphic factors, vegetation and bacterial composition on the sustainability of phytomanagement at semiarid mine tailings

Influencia de los factores edáficos, la vegetación y la composición bacteriana en la sostenibilidad del fitomanejo en depósitos de lodos de flotación en ambientes semiáridos

Y. Risueño^{1*}, C. Petri², H.M. Conesa¹

¹Departamento de Ingeniería Agronómica, ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena. Spain.

²Departamento de Fruticultura Subtropical y Mediterránea, IHSM-CSIC La Mayora, Avenida Dr. Wienberg, s/n, 29750 Algarrobo-Costa, Málaga. Spain.

*yolanda.risueno@upct.es

Abstract

Mine tailings piles are considered one of the most environmental damaging anthropogenic issues worldwide due to the occurrence of high metal(loid)s concentrations. In order to achieve tailings' restoration, phytomanagement has raised up as an interesting alternative, which consists of improving a self-sustaining vegetation cover. In this process the bacterial community, adapted to extreme conditions, may play an important role. The objective of this work was to elucidate which factors, including edaphic, vegetation and bacterial composition aspects, determine soil functionality in the phytomanagement of mine tailings piles in semiarid areas. The presence of plants in vegetated patches at tailings revealed a positive effect on soil fertility and microbiological indicators, stimulating the presence of bacterial orders involved in key biogeochemical cycles. This functionality of impacted tailings sites, which even showed unfavourable edaphic conditions, may support its long-term sustainability.

Keywords: mining tailings; phytomanagement; metals; salinity; microbial community.

Resumen

Los depósitos de lodos de flotación son considerados un grave problema medio ambiental debido a la presencia de elevadas concentraciones de metales pesados. Con la intención de alcanzar su restauración, se han propuesto técnicas de fitomanejo consistentes en formar una cubierta vegetal estable sobre sus superficies. Para conseguir esto, puede ser beneficioso contar con una comunidad bacteriana adaptada a las condiciones adversas específicas de estos residuos. El objetivo de este proyecto fue evaluar qué factores (edáficos, vegetación y composición bacteriana) determinan la funcionalidad del suelo durante los procesos de fitomanejo en zonas mineras semiáridas. El estudio reveló que la vegetación presente en los depósitos mineros fue capaz de estimular, a pesar de las condiciones edáficas deficientes, el desarrollo de una comunidad bacteriana organotrófica implicada en ciclos biogeoquímicos de nutrientes, y por lo tanto, con capacidad para apoyar la sostenibilidad a largo plazo del sistema.

Palabras clave: depósitos mineros; fitomanejo; metales; salinidad; comunidad microbiana.

1. INTRODUCCIÓN

Los depósitos de lodos de flotación provienen de la acumulación de residuos generados por las actividades de minería metálica. Se trata de estructuras inestables con condiciones extremas de suelo, como elevadas concentraciones de metal(oid)es, elevada salinidad y baja fertilidad (1). Con el objetivo de restaurar estos depósitos, algunos estudios han valorado la posibilidad de generar una cubierta vegetal estable con especies autóctonas adaptadas a las condiciones climáticas locales (fitomanejo por fitoestabilización) (2). Sin embargo, los procesos de fitoestabilización están limitados por las condiciones edáficas de los depósitos que pueden dificultar el desarrollo de vegetación (3). En este sentido, las comunidades bacterianas presentes en los residuos mineros pueden jugar un papel muy importante en el establecimiento de la vegetación al interactuar positivamente con las rizosferas, actuando como filtro de metales y/o participando en ciclos biogeoquímicos de nutrientes (4).

El objetivo de este proyecto fue evaluar qué factores (edáficos, vegetación y composición bacteriana) determinan la funcionalidad del suelo durante los procesos de fitomanejo por fitoestabilización en zonas mineras semiáridas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El área de estudio pertenece al Distrito Minero de Cartagena-La Unión. El muestreo fue realizado a lo largo de un transecto (Fig. 1A) trazado desde un área no afectada por la actividad minera (control) hasta la meseta de un depósito de lodos de flotación, incluyendo diferentes microambientes y rizosferas de vegetación espontánea en el mismo. En cada etapa del transecto se tomaron muestras compuestas de suelo ($n \geq 3$), las cuales se emplearon para su caracterización físico-química y microbiológica (composición bacteriana). Los análisis estadísticos se realizaron con los programas SPSS 22 y CANOCO for WINDOWS v4.02.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las variaciones en las propiedades de suelo a través del transecto experimental determinaron un gradiente ambiental definido por parámetros como pH, carbono orgánico (CO) o nitrógeno total (NT), los cuales correlacionaron negativamente con la concentración total de metales y los parámetros de salinidad (conductividad eléctrica (CE) y SO_4^{2-}) (Fig. 1B). Sin embargo, dentro del depósito, se generó un gradiente secundario definido principalmente por la salinidad, donde la concentración de metales jugó un papel secundario (Fig. 1B). Como ya se ha indicado en otros estudios realizados en ambientes afectados por actividades mineras, la variabilidad espacial de la concentración de metales totales en estos depósitos con condiciones de pH neutro, no parecen ser motivo suficiente para la generación de nichos específicos en el desarrollo de plantas y/o microorganismos (5). Sin embargo, otros factores físico-químicos como la salinidad o la textura han mostrado una gran relevancia en el desarrollo de los procesos de sucesión edáfica (6). Así, las zonas desnudas de vegetación dentro del depósito, caracterizadas por elevados valores de CE, mostraron una composición bacteriana principalmente litotrófica (ej. órdenes de *Gammaproteobacteria*) (Fig. 2). Sin embargo, las zonas del depósito con menor salinidad promovieron la presencia de vegetación, lo que favoreció mayores valores de parámetros relacionados con fertilidad (CO, NT) y el desarrollo de una comunidad bacteriana principalmente organotrófica (ej. *Cytophagales*) (7). Las rizosferas de las plantas muestreadas dentro del depósito compartieron grupos bacterianos con las muestras de suelo externas al depósito (control y borde externo). Estos grupos juegan un papel importante en la sostenibilidad de los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes. Un ejemplo es el caso del orden *Rhizobiales* (Fig. 2), el cual ha sido ampliamente relacionado con la fijación de nitrógeno (8).

4. CONCLUSIONES

El estudio de microambientes en depósitos mineros reveló la importancia de la fertilidad del suelo, y por tanto, de la presencia de vegetación espontánea para estimular el desarrollo de una comunidad bacteriana implicada en la sostenibilidad de los ciclos biogeoquímicos. Por todo esto, es importante tener en cuenta la microbiología nativa, adaptada a las condiciones edáficas específicas, de cara a asegurar la sostenibilidad a largo plazo de los proyectos de fitomanejo en estos ambientes.

5. AGRADECIMIENTOS

Proyecto financiado por FEDER/Ministerio de Ciencia e Innovación–Agencia Estatal de Investigación. Proyecto CGL2017-82264-R.

6. REFERENCIAS

1. Mendez MO, Maier RM. Phytoremediation of mine tailings in temperate and arid environments. *Rev Environ Sci Biotechnol*. 2008;7(1):47–59.
2. Conesa HM, Schulin R. The Cartagena-La Unión mining district (SE Spain): A review of environmental problems and emerging phytoremediation solutions after fifteen years research. *J Environ Monit*. 2010;12(6):1225–33.
3. Párraga-Aguado I, Álvarez-Rogel J, González-Alcaraz MN, Jiménez-Cárceles FJ, Conesa HM. Assessment of metal(loid)s availability and their uptake by *Pinus halepensis* in a Mediterranean forest impacted by abandoned tailings. *Ecol Eng*. 2013;58:84–90.
4. Thavamani P, Samkumar RA, Satheesh V, Subashchandrabose SR, Ramadass K, Naidu R, et al. Microbes from mined sites: Harnessing their potential for reclamation of derelict mine sites. *Environ Pollut*. 2017;230:495–505.
5. Parraga-Aguado I, Gonzalez-Alcaraz MN, Alvarez-Rogel J, Jimenez-Carceles FJ, Conesa HM. The importance of edaphic niches and pioneer plant species succession for the phytomanagement of mine tailings. *Environ Pollut*. 2013;176:134–43.
6. Anawar HM, Canha N, Santa-Regina I, Freitas MC. Adaptation, tolerance, and evolution of plant species in a pyrite mine in response to contamination level and properties of mine tailings: Sustainable rehabilitation. *J Soils Sediments*. 2013;13(4):730–41.
7. Sun X, Zhou Y, Tan Y, Wu Z, Lu P, Zhang G, et al. Restoration with pioneer plants changes soil properties and remodels the diversity and structure of bacterial communities in rhizosphere and bulk soil of copper mine tailings in Jiangxi Province, China. *Environ Sci Pollut Res*. 2018;25(22):22106–19.
8. Jones RT. A Comprehensive Survey of Soil Rhizobiales Diversity Using High-Throughput DNA Sequencing. *Biol Nitrogen Fixat*. 2015;2(2):769–76.

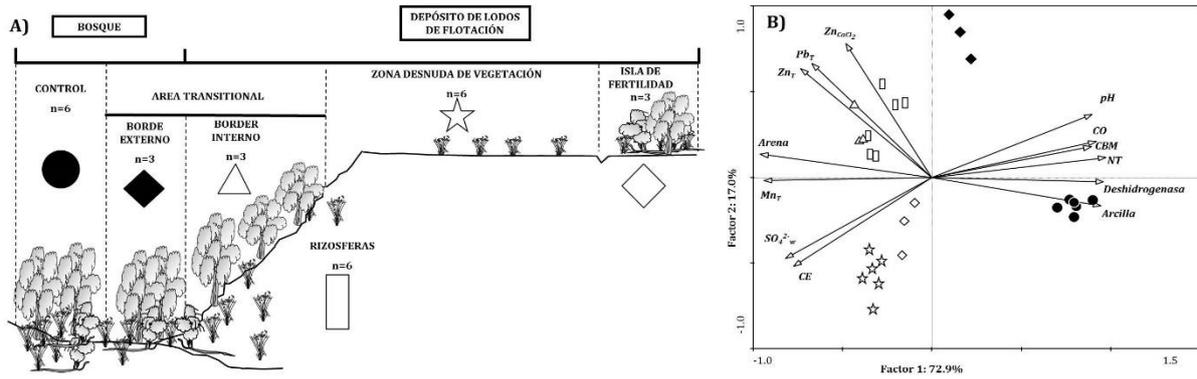


Figura 1. A) Esquema del transecto de muestreo. Los símbolos para cada sitio son empleados en la Fig. 1B. **B)** Resultados del Análisis de Componente Principal (ACP). Mt es concentración total del elemento M; “SO₄²⁻” es la concentración de sulfato extraíble en agua; “M_{CaCl₂}” es la concentración del elemento M extraído en 0,01 M de CaCl₂; “CO” es el Carbono Orgánico; “NT” es la concentración de nitrógeno total; Arena y Arcilla son los porcentajes correspondientes al tamaño de partícula; “CE” y “pH” son Conductividad Eléctrica y pH, respectivamente, del extracto 1:5 suelo:agua; “CBM” es el Carbón de la Biomasa Microbiana; Deshidrogenasa es la actividad enzimática.

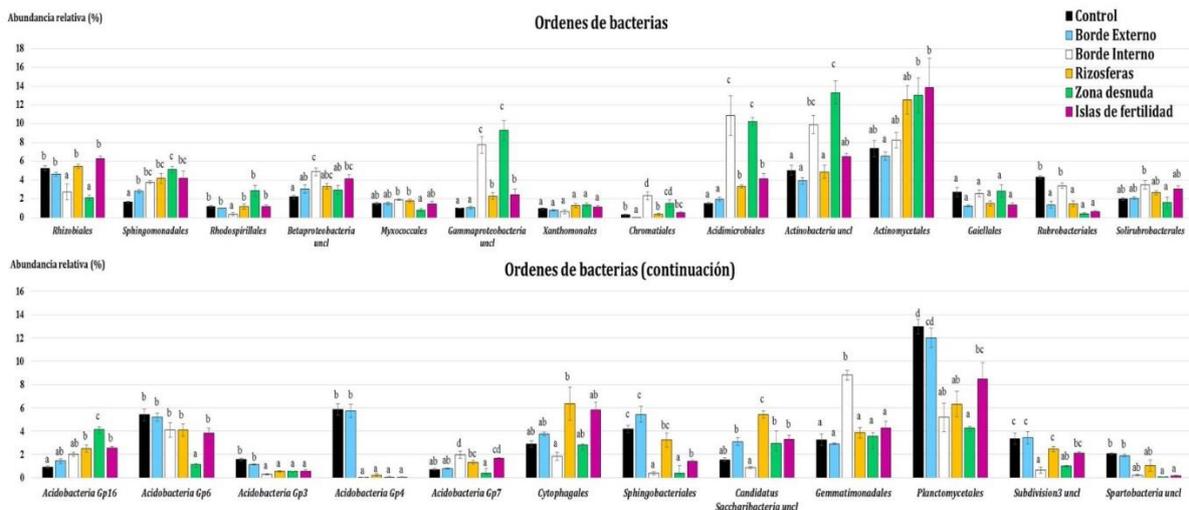


Figura 2. Representación de la abundancia relativa (%) de los órdenes bacterianos en cada área del transecto de muestreo. Las letras sobre cada columna indican diferencias significativas entre las zonas para cada orden bacteriano (ANOVA con el test de Tukey, $p < 0,05$). El número de réplicas fue de 3 o 6, especificado en Fig. 1A.

Methodology to determine infiltration rates in agricultural soils based on weighing lysimetry

Metodología para determinación de tasas de infiltración en suelos agrícolas basada en lisimetría de pesada

L. Ávila-Dávila^{1,2*}, M. Soler-Méndez², C.F. Bautista-Capetillo¹, J. González-Trinidad¹, J.M. Molina-Martínez²

¹Universidad Autónoma de Zacatecas, Campus UAZ Siglo XXI, Carretera Zacatecas-Guadalajara Km. 6, Ejido La Escondida, C.P. 98160 Zacatecas, Zacatecas. Mexico.

²Departamento de Ingeniería Agronómica, ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena. Spain.

*laura_14avila@hotmail.com

Abstract

An experiment was conducted to quantify the rate of a silty loam soil from the minute data of a weighing lysimeter, analysing different rainfall events with two soil moisture conditions, above and below field capacity. The detailed information of the data allowed to draw and know the infiltration capacity curve of the soil. The results showed a maximum infiltration rate 22.9 % higher when the soil was below the moisture content at field capacity than when the soil was above this moisture content. The basic or stable rate was similar for both cases (standard deviation of 0.03 mm h⁻¹). Based on these results, it can be assumed that a soil with a lower moisture content has a higher initial infiltration capacity but always tends to have the same stable rate.

Keywords: moisture content; water mass; water balance; rain events.

Resumen

Un experimento fue conducido para cuantificar la tasa de un suelo franco limoso a partir de los datos de un lisímetro de pesada, analizando diferentes eventos de lluvia con dos condiciones de humedad del suelo, por encima y por debajo de la capacidad de campo. La información detallada de los datos permitió dibujar y conocer a detalle la curva de capacidad de infiltración del suelo. Los resultados mostraron una tasa de infiltración máxima 22,9 % mayor cuando el suelo estaba por debajo del contenido de humedad a capacidad de campo que cuando este estaba por encima de dicha humedad. En cuanto a la tasa básica o estable fue similar para ambos casos (desviación estándar de 0,03 mm h⁻¹). Con estos resultados puede asumirse que un suelo con menor contenido de humedad presenta mayor capacidad de infiltración inicial pero que siempre tienden a una misma tasa estable.

Palabras clave: contenido de humedad; masa de agua; balance hídrico; eventos de lluvia.

1. INTRODUCCIÓN

El suelo es uno de los principales factores a tomar en cuenta en la planeación y desarrollo del riego. Uno de los indicadores de calidad del suelo es la tasa de infiltración, que tan rápido entra el agua. Se considera un riego ineficiente aquel que supera la tasa infiltración que tiene el suelo formando escurrimientos superficiales y que a su paso irán erosionando el suelo (1,2). La tasa de infiltración es muy variable tanto en espacio como en tiempo debido a numerosos factores como

son: la textura del suelo, contenido de humedad, prácticas de cultivación, variaciones climáticas, cobertura foliar, raíces, entre otros (1,3,4).

Los infiltrómetros son usados frecuentemente para estimar la infiltración acumulada en función del tiempo *in situ*, con estos dispositivos es asumido un movimiento vertical y se requiere de gran tiempo de prueba para obtener mejor estimación de infiltración; sin embargo, puede existir errores en la determinación de la infiltración debido al flujo lateral de agua en el suelo debajo del infiltrómetro (5). Un dispositivo con mejor precisión en la determinación de flujos de agua en el suelo-planta-atmosfera es el lisímetro de pesada (6-9). Estos han sido usados para cuantificar la precipitación, condensación y evapotranspiración del cultivo (6,10,11).

El objetivo de esta comunicación es caracterizar la infiltración de un suelo franco limoso, cuando el contenido de agua está por encima y por debajo de su capacidad de campo, por medio de las variaciones de masa de un lisímetro de pesada. Para lograr esto, se cumplirán los siguientes objetivos específicos, i) obtener el contenido de agua a capacidad de campo del suelo, ii) establecer los eventos de lluvia que llevaron al suelo por encima de capacidad de campo y cuales no para analizarlos y iii) determinar la tasa de infiltración del agua en el suelo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Área de estudio

La experimentación fue realizada en la parcela Las Tiesas en Albacete, España. Esta zona es caracterizada como semiárida y con un suelo clasificado como franco limoso a partir de los porcentajes de suelo (27,1 % arena, 51,5 % limo y 21,4 % arcilla) y el triángulo de textura de la USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos) y densidad aparente de 1,38 g cm⁻³.

El lisímetro de pesada cuenta con dos recipientes, uno es donde esta almacenado el perfil del suelo denominado recipiente de cultivo (RC) y el otro almacena el agua drenada por el RC denominado depósito de drenaje (DD). Las dimensiones del RC son 0,56 x 0,96 x 0,35 m con una resolución de medición de 20 g y el DD tiene una resolución de medición de 1 g.

2.2 Cálculo del contenido de humedad a capacidad de campo, θ_{CC}

Los contenidos de agua volumétricos (θ_v) del perfil del suelo fueron determinados con la masa del RC y por el método gravimétrico. La capacidad de campo quedo establecida dos o tres días después de los eventos de lluvia cuando el RC ha dejado de drenar y, por lo tanto, estaba constante indicando que suelo ha llegado al instante en que es capaz de retener el agua (12).

2.3 Estimación de la tasa de infiltración

Para la estimación de la tasa de infiltración ($\frac{dl}{dt}$) es necesario establecer dos casos: i) por encima de θ_{CC} y ii) por debajo de θ_{CC} . Así que, las $\frac{dl}{dt}$ quedan como sigue: i) $\frac{dl}{dt} = \frac{dDD}{dt}$ y ii) $\frac{dl}{dt} = \frac{dLL}{dt}$, donde $\frac{dDD}{dt}$ es la variación másica del DD en g y $\frac{dLL}{dt}$ es la variación másica de la lluvia en g.

En el primero caso, como el suelo ha superado la θ_{CC} del suelo este comenzará a drenar ya que el suelo no será capaz de almacenar más agua, por lo que el drenaje representa el agua que está siendo desplazada para poder dejar entrar más agua de lluvia. En el segundo caso, se determina que todo lo que llueve ingresa al perfil del suelo. En estos casos la escorrentía superficial es tomada como nula ya que como lo establece ya que la lluvia nunca sobrepasa la capacidad de infiltración de este suelo propuesta por Ali (2), el cual es uno de los valores bajos propuestos en la literatura. Además, Cammeraat (13) nos dice que valores de precipitaciones menores a 30 mm d⁻¹ no producen escorrentía, que aplica en esta investigación. La lluvia fue determinada siguiendo la metodología de (11,14,15).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Contenido de humedad a capacidad de campo, θ_{CC}

Fue posible determinar el θ_{CC} en dos instantes de tiempo con un mes de diferencia estableciéndose en $0,316 \pm 0,002 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3}$. El valor obtenido fue comparado con diferentes valores en la literatura y el que presentó menor desviación estándar fue el propuesto por Assi et al. (16) con $0,011 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3}$ y después el propuesto por Allen et al. (17) con $0,071 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3}$.

3.2 Tasa de infiltración de agua en el suelo

Cuando el suelo está en el primer caso presentó tasas máximas de $5,83 \pm 0,55 \text{ mm h}^{-1}$ en promedio, mientras que la tasa básica o estable estuvo en $1,19 \pm 0,25 \text{ mm h}^{-1}$ (Fig. 1a). Para el segundo caso (Fig. 1b), presentó una mayor tasa máxima de infiltración de $7,16 \pm 0,08 \text{ mm h}^{-1}$ esto porque la lluvia comenzó cuando el suelo estuvo aun estaba por debajo de θ_{CC} , la tasa básica quedó establecida en $1,15 \pm 0,26 \text{ mm h}^{-1}$ similar al primer caso. Al hacer una comparación de estos resultados con la literatura fue encontrado que coinciden con lo reportado por Li et al. (18). Los resultados reflejan de manera indirecta como afectan el crecimiento de las raíces, la aplicación de los fertilizantes, la compactación del suelo por el peso ejercido por el agua en la capacidad de infiltración del agua en el suelo.

4. CONCLUSIONES

Fue establecida la capacidad de infiltración de franco limoso a partir de datos de masa de un lisímetro de pesada. Al analizar la tasa de infiltración de manera separa por su contenido de humedad al inicio de la lluvia, haber alcanzado o no la capacidad de campo, permitió ver como la intensidad de lluvia influye más en la tasa de infiltración inicial del suelo, siendo mayor cuando el suelo cuenta con menor contenido de humedad y al final alcanzará una tasa básica o estable similar. En futuras investigaciones recomendado comparar los valores obtenidos con el lisímetro de pesada con un infiltrómetro.

5. AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto de Investigación y Desarrollo con referencia IDI-20190146, en colaboración con la empresa AGROSOLMEN, S.L. cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a través del Programa Operativo Plurirregional de España 2014-2020. Al Instituto Técnico Agronómico Provincial de Albacete (ITAP) y al Centro Regional de Estudios del Agua (CREA) de Albacete.

6. REFERENCIAS

1. Liu Y, Cui Z, Huang Z, López-Vicente M, Wu GL. Influence of soil moisture and plant roots on the soil infiltration capacity at different stages in arid grasslands of China. *Catena*. 2019;182:104147.
2. Ali H. *Fundamentals of irrigation and on-farm water management*. Springer Science & Business Media; 2010;557.
3. Cui Z, Wu GL, Huang Z, Liu Y. Fine roots determine soil infiltration potential than soil water content in semi-arid grassland soils. *J Hydrol*. 2019;578(26):124023. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2019.124023>
4. Yang M, Zhang Y, Pan X. Improving the Horton infiltration equation by considering soil moisture variation. *J Hydrol*. 2020;586:124864. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2020.124864>
5. Simões WL, Figueirêdo VB, Silva ELD. Uso do cilindro infiltrômetro único em diferentes solos. *Eng Agrícola*. 2005;25(2):259–366.

6. Schrader F, Durner W, Fank J, Gebler S, Pütz T, Hannes M, et al. Estimating Precipitation and Actual Evapotranspiration from Precision Lysimeter Measurements. *Procedia Environ Sci.* 2013;19:543–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.proenv.2013.06.061>
7. Groh J, Vanderborght J, Pütz T, Vereecken H. How to control the lysimeter bottom boundary to investigate the effect of climate change on soil processes? *Vadose Zo J.* 2016;15(7):1–15.
8. Masarik KC, Norman JM, Brye KR, Baker JM. Improvements to measuring water flux in the vadose zone. *J Environ Qual.* 2004;33(3):1152–8.
9. Lepore BJ, Norman JM, Lowery B, Brye KR. Soil compaction above long-term lysimeter installations. *Soil Sci Soc Am J.* 2011;75(1):30–4.
10. Meissner R, Seeger J, Rupp H, Seyfarth M, Borg H. Measurement of dew, fog, and rime with a high-precision gravitation lysimeter. *J Plant Nutr Soil Sci.* 2007;170(3):335–44.
11. Haselow L, Meissner R, Rupp H, Miegel K. Evaluation of precipitation measurements methods under field conditions during a summer season: A comparison of the standard rain gauge with a weighable lysimeter and a piezoelectric precipitation sensor. *J Hydrol.* 2019;575:537–43. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2019.05.065>
12. Kirkham MB. *Principles of Soil and Plant Water Relations.* Academic Press. 2010;485.
13. Cammeraat ELH. Scale dependent thresholds in hydrological and erosion response of a semi-arid catchment in southeast Spain. *Agric Ecosyst Environ.* 2004;104(2):317–32.
14. Hannes M, Wollschläger U, Schrader F, Durner W, Gebler S, Pütz T, et al. High-resolution estimation of the water balance components from high-precision lysimeters. *Hydrol Earth Syst Sci Discuss.* 2015;12(1):569–608.
15. Peters A, Nehls T, Schonsky H, Wessolek G. Separating precipitation and evapotranspiration from noise - A new filter routine for high-resolution lysimeter data. *Hydrol Earth Syst Sci.* 2014;18(3):1189–98.
16. Assi AT, Blake J, Mohtar RH, Braudeau E. Soil aggregates structure-based approach for quantifying the field capacity, permanent wilting point and available water capacity. *Irrig Sci.* 2019;37(4):511–22. <https://doi.org/10.1007/s00271-019-00630-w>
17. Allen RG, Pereira LS, Raes D, Smith M. *Crop evapotranspiration-Guidelines for computing crop water requirements-FAO Irrigation and drainage paper 56.* Fao, Rome. 1998;300(9):D05109.
18. Li Y, Ren X, Hill R, Malone R, Zhao Y. Characteristics of Water Infiltration in Layered Water-Repellent Soils. *Pedosphere.* 2018;28(5):775–92.

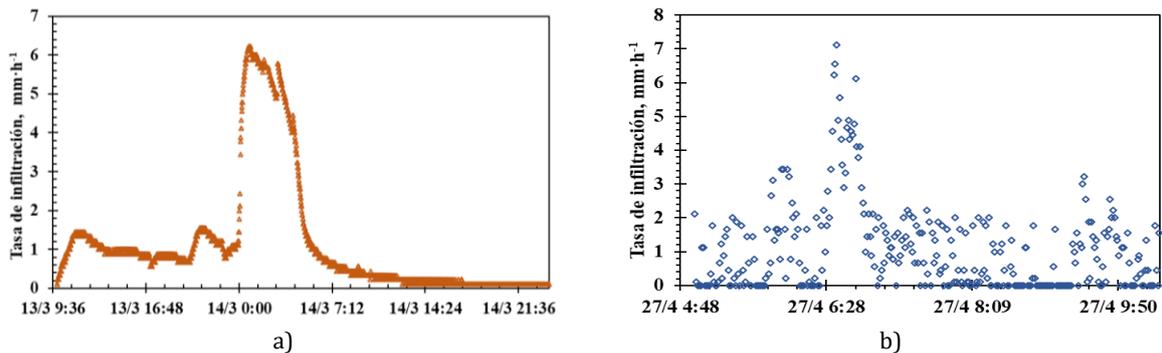


Figura 1. Capacidad de infiltración de agua en el suelo, a) por encima de θ_{CC} y b) por debajo de θ_{CC} .

Changes in bacterial and fungal communities under extended organic and conventional management

Cambios en las comunidades bacterianas y fúngicas bajo la aplicación de un manejo orgánico y convencional prolongado en el tiempo

J. Cuartero^{1*}, M. Ros¹, J.A. Pascual¹, J.M. Vivo²

¹Centro de Edafología Aplicada del Segura (CEBAS)-CSIC, Campus Universitario de Espinardo, 30100 Murcia. Spain.

²Departamento de Estadística e Investigación Operativa, Universidad de Murcia, Campus Universitario de Espinardo, CMN & IMIB-Arrixaca, 30100 Murcia. Spain.

*jessica.cuartero@um.es

Abstract

In this paper, we assessed the long-term effect of agricultural management of two organic cropping systems and conventional system with the same crops history, on bacterial and fungal soil community structure through high-throughput sequencing analysis and their interaction with soil physicochemical properties and crop yield. Results showed that crop yield during the last cycle were similar among the three cropping systems. Changes in microbial community was tested in both bacterial and fungal, although diversity only varied in fungi. Our results suggest that long-term application of compost not only increased organic material and nutrient but change bacterial and fungal community structure.

Keywords: manure compost; high-throughput sequencing; microbiome.

Resumen

En este trabajo, se estudia el efecto de dos tipos de sistemas de cultivos orgánicos y uno convencional, los tres con el mismo historial de cultivos en las comunidades microbiológicas, tanto fúngicas como bacterianas, a través de la secuenciación de alto rendimiento y, además, su interacción con las propiedades del suelo y la producción. Los resultados mostraron que durante el último ciclo la cosecha la producción fue similar entre los tres sistemas de cultivo. Ocurrieron cambios en las comunidades microbianas, tanto en hongos, como en bacterias, aunque la diversidad solo se vio afectada en hongos. Nuestros resultados sugieren que la aplicación de compost no solo incrementa la materia orgánica y los nutrientes, sino que también produce cambios en la estructura bacteriana y fúngica.

Palabras clave: compost de estiércol; secuenciación; microbioma.

1. INTRODUCCIÓN

A día de hoy, los suelos de todo el mundo se encuentran moderada o altamente degradados (1), esta degradación, viene favorecida por la utilización de fertilizantes sintéticos, pesticidas, herbicidas en los sistemas de cultivos convencionales (2), lo que ha generado que la producción se vea afectada, que se produzca un incremento en los gases de efecto invernadero y, además de la degradación del suelo, que se produzca la pérdida de biodiversidad (3,4). Debido a esto, ha aumentado el interés por otros tipos de sistemas de cultivo, como el orgánico. El cultivo orgánico es definido por la comisión europea como “aquella que se basa en un sistema sostenible que

respeto el medio ambiente y el bienestar animal, pero también incluye todas las demás etapas de la cadena de suministro de alimentos (suministro de materias primas, procesamiento, almacenamiento, transporte, distribución y servicios minoristas)". Con este tipo de manejo, se incluyen el uso de fertilizantes respetuosos, como el estiércol o el compost.

Los microorganismos del suelo, son fundamentales para muchos de los procesos biogeoquímicos que ocurren en el suelo, como el ciclo del carbono, la descomposición o la propia formación de los agregados del suelo (5). Los enfoques recientes como la secuenciación a nivel bacteriano y fúngico pueden mostrar cambios taxonómicos que dan forma a patrones de interacciones ecológicas que regulan la estructura, función y resistencia de las comunidades microbianas del suelo bajo agricultura orgánica en comparación con la agricultura convencional. En general, se ha reportado que el manejo orgánico produce cambios en la comunidad microbiana debido al incremento de los nutrientes (6) y que además favorece a la diversidad. Sin embargo, es un tema muy complejo y controvertido (7,8).

El objetivo de este trabajo es el de estudiar el efecto del manejo orgánico y convencional en el suelo, tanto en las propiedades del suelo, como en las comunidades microbianas y fúngicas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Descripción del experimento

La parcela experimental, situada en Cartagena, está constituida por tres subparcelas de 2000 m² cada una. En una se realiza un manejo convencional (Inorg), en otra un manejo orgánico con la aplicación de estiércol (Org_M) y en la tercera se realiza un manejo orgánico con la aplicación de compost y té de compost (Org_C). Las parcelas experimentales llevan más de 25 años cultivándose, aunque con agricultura orgánica, llevan 15 y 8 años respectivamente. Las muestras se recogieron en el año 2018, en febrero, después de la cosecha de col (*Brassica olearacea* var. *Sabellica*), la cual se cultiva en rotación con el melón (col en invierno, melón en verano). Se recogieron un total de 5 muestras aleatorias por tratamiento.

2.2 Propiedades del suelo, secuenciación y cosecha

Distintos parámetros fisicoquímicos y biológicos fueron medidos. Nitrógeno total (TN), pH, conductividad eléctrica (EC), carbono orgánico total (TOC), cationes: Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, Na⁺ y la capacidad catiónica (CEC), carbono inorgánico (IC), CaCO₃, carbono orgánico particulado (POC) o el contenido de humedad en el suelo (F_{Ma}) son algunos de ellos, aunque también se realizó la medición de ciertos patógenos como: *Fusarium Oxysporum* (FOX), *Rhizoctonia solani* (RSO) o *Alternaria* spp. (ALT). El estudio de la comunidad microbiana se realizó a través de la amplificación por PCR utilizando, para ello, la plataforma Ion Torrent en el caso de las bacterias (amplificación de las regiones V2,4,8) e Illumina en el caso de los hongos (amplificación de la región ITS). El análisis bioinformático incluyó la eliminación de ruido generado por la PCR, el filtrado de calidad en las secuencias (Q>25) y la eliminación de posibles malas asignaciones ("singletons"), las secuencias utilizadas fueron normalizadas por rarefacción. La cosecha fue calculada utilizando el peso de todas las plantas aptas para su venta por parcela (kg ha⁻¹).

2.3 Análisis estadístico

Para estudiar las diferencias en las propiedades del suelo (fisicoquímicos y biológicos) se aplicaron distintas pruebas estadísticas dependiendo de si se verificaban las condiciones de normalidad y homocedastidad previamente comprobadas: Kruskal-Wallis, Anova de una vía o test de Welch. Aquellos parámetros que resultaron significativos, se representaron a través de un ACP. Para estudiar la comunidad microbiana, tanto en hongos como bacterias, se calcularon los índices de diversidad (Shannon e inverso de Simpson) y el de riqueza (Chao1), además, para conocer la variación que se había producido a nivel microbiano, se realizó un PERMANOVA utilizando la

distancia de Bray-Curtis. Otras características de las estructuras de las comunidades microbianas de los sistemas de cultivo fueron estudiadas aplicando técnicas estadísticas multivariantes para el análisis de datos de alto rendimiento.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Nuestros resultados mostraron que las propiedades del suelo están influenciadas por el manejo del mismo (Fig. 1). Concretamente, el gráfico muestra cohesión entre los tratamientos orgánicos, que a su vez están separados del inorgánico. En general, se puede apreciar un incremento de TOC, TN, NH₄ y DNA en Org_C, que sugiere una mayor capacidad nutritiva y de biomasa debido a la aplicación prolongada de compost como materia orgánica estable (9). No se encontraron diferencias significativas entre los índices de diversidad a nivel de bacterias, pero sí a nivel de hongos. En este aspecto es muy difícil alcanzar un consenso entre la comunidad científica, ya que se han reportado casos donde la comunidad fúngica aumenta, pero otros en los cuales, disminuye (10–12). Se encontraron diferencias significativas en las comunidades microbianas, siendo más altas en hongos que en bacterias (Fig. 2), aunque estas se mostraron más influenciadas por las propiedades del suelo, especialmente por TOC, NH₄ y DNA, que los hongos. Además, se clasificaron algunos microorganismos como biomarcadores en Inorg, como por ejemplo las *Pseudoalteromonas*, capaces de producir metabolitos antimicrobianos (13) o *Haliangium*, en Org_C capaces de producir metabolitos antifúngicos (14), lo que nos permite conocer en mayor profundidad las interacciones entre las comunidades microbianas del suelo. No hubo diferencias significativas entre las cosechas de los distintos tratamientos.

4. CONCLUSIONES

Nuestros resultados aportan un mayor entendimiento de la interacción entre la comunidad microbiana y las propiedades del suelo, además, avalan la teoría de que no existen grandes diferencias en cuanto a la producción, posiblemente debido al aporte de nutrientes por el compost. También se confirma que la comunidad bacteriana es más sensible que la comunidad fúngica a las variaciones en las propiedades del suelo pero que la diversidad fúngica puede verse más afectada por el sistema de cultivo.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradecer a Diverfarming la participación en este proyecto, el cual está financiado por el programa H2020.

6. REFERENCIAS

1. WRB IU of SSWG. World reference base for soil resources 2014 (update 2015), international soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. World Soil Resour Reports, FAO, Rome. 2015;
2. Shen W, Lin X, Shi W, Min J, Gao N, Zhang H, et al. Higher rates of nitrogen fertilization decrease soil enzyme activities, microbial functional diversity and nitrification capacity in a Chinese polytunnel greenhouse vegetable land. *Plant Soil*. 2010;337(1–2):137–50.
3. Rockström J, Steffen W, Noone K, Persson Å, Chapin FS, Lambin EF, et al. A safe operating space for humanity. *Nature*. 2009;461(7263):472–5.
4. Godfray HCJ, Beddington JR, Crute IR, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, et al. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science* (80-). 2010;327(5967):812–8.
5. Dangi SR, Bañuelos G, Buyer JS, Hanson B, Gerik J. Microbial community biomass and structure in saline and non-saline soils associated with salt-and boron-tolerant poplar clones grown for the phytoremediation of

selenium. *Int J Phytoremediation*. 2018;20(2):129–37.

6. Chaudhry V, Rehman A, Mishra A, Chauhan PS, Nautiyal CS. Changes in bacterial community structure of agricultural land due to long-term organic and chemical amendments. *Microb Ecol*. 2012;64(2):450–60.
7. Gonthier DJ, Ennis KK, Farinas S, Hsieh H-Y, Iverson AL, Batáry P, et al. Biodiversity conservation in agriculture requires a multi-scale approach. *Proc R Soc B Biol Sci*. 2014;281(1791):20141358.
8. Reilly K, Cullen E, Lola-Luz T, Stone D, Valverde J, Gaffney M, et al. Effect of organic, conventional and mixed cultivation practices on soil microbial community structure and nematode abundance in a cultivated onion crop. *J Sci Food Agric*. 2013;93(15):3700–9.
9. Ros M, Hernandez MT, García C. Soil microbial activity after restoration of a semiarid soil by organic amendments. *Soil Biol Biochem*. 2003;35(3):463–9.
10. Zhou J, Jiang X, Zhou B, Zhao B, Ma M, Guan D, et al. Thirty four years of nitrogen fertilization decreases fungal diversity and alters fungal community composition in black soil in northeast China. *Soil Biol Biochem*. 2016;95:135–43.
11. Zheng Y-K, Miao C-P, Chen H-H, Huang F-F, Xia Y-M, Chen Y-W, et al. Endophytic fungi harbored in *Panax notoginseng*: diversity and potential as biological control agents against host plant pathogens of root-rot disease. *J Ginseng Res*. 2017;41(3):353–60.
12. Chen W, Xu R, Chen J, Yuan X, Zhou L, Tan T, et al. Consistent responses of surface-and subsurface soil fungal diversity to N enrichment are mediated differently by acidification and plant community in a semi-arid grassland. *Soil Biol Biochem*. 2018;127:110–9.
13. Offret C, Desriac F, Le Chevalier P, Mounier J, Jégou C, Fleury Y. Spotlight on antimicrobial metabolites from the marine bacteria *Pseudoalteromonas*: chemodiversity and ecological significance. *Mar Drugs*. 2016;14(7):129.
14. Kundim BA, Itou Y, Sakagami Y, Fudou R, Izuka T, Yamanaka S, et al. New haliangicin isomers, potent antifungal metabolites produced by a marine myxobacterium. *J Antibiot (Tokyo)*. 2003;56(7):630–8.

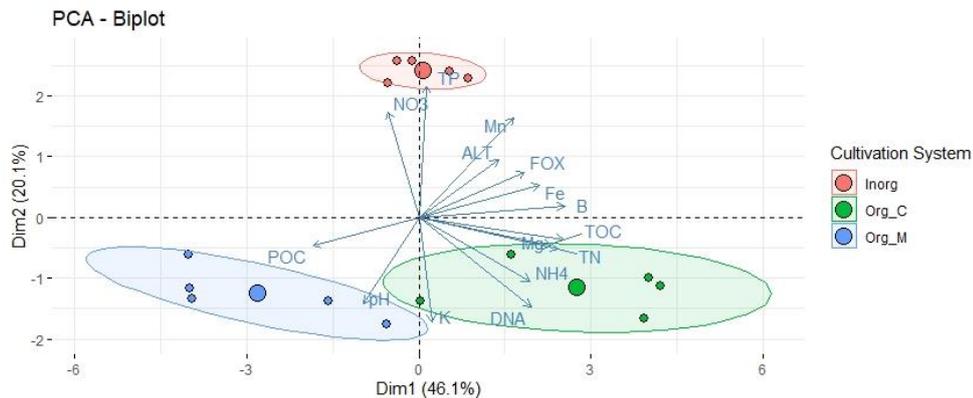


Figura 1. Biplot mostrando las propiedades del suelo que se han visto significativamente alteradas por el tipo de manejo.

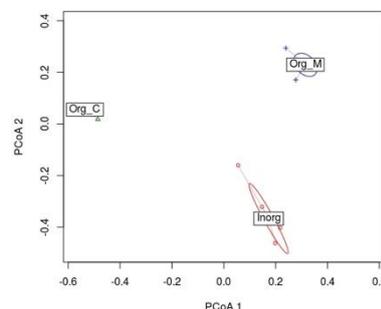


Figura 2. Principal Coordinate Analysis (PCoA) de la comunidad fúngica.

Mathematical methods to analyze growth and movement phenotypes

Métodos matemáticos para analizar fenotipos de crecimiento y movimiento

M.V. Díaz-Galián^{1*}, F. Perez-Sanz², J.D. Sanchez-Pagán³, J. Weiss¹, M. Egea-Cortines¹, P.J. Navarro⁴

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

²Biomedical Informatic and Bioinformatic Platform, Biomedical Research Institute of Murcia, University Clinical Hospital 'Virgen de la Arrixaca', University of Murcia, 30120, Murcia. Spain.

³Ecología y Nuevas Tecnologías, Avda. Lorca 193, 30835 Sangonera la Seca, Murcia. Spain.

⁴Departamento de Tecnologías de la Información y las Comunicaciones, ETSIT, UPCT, Campus Muralla del Mar, s/n, 30202 Cartagena. Spain.

*mariavictoria.diaz@edu.upct.es

Abstract

Phenotyping using image analysis can be useful to measure both growth and organ movement. This study proposes a set of tools to analyse both features. Several species with different growth habits were used including *Antirrhinum majus*, *A. linkianum*, *Petunia x hybrida* and *Fragaria x ananassa*. These analyses revealed how different interpretations could be made depending on the mathematical method. The results indicated that different mathematical fits should be used and not only one as fits can show different information.

Keywords: plant growth; image acquisition; phenomics.

Resumen

El fenotipado con análisis de imagen puede ser útil para medir tanto crecimiento como el movimiento de un órgano vegetal. Este estudio propone un conjunto de herramientas para analizar ambas características. Varias especies con diferentes patrones de crecimientos fueron usadas: *Antirrhinum majus*, *A. linkianum*, *Petunia x hybrida* y *Fragaria x ananassa*. Los análisis revelaron cómo diferentes interpretaciones pueden hacerse dependiendo del método de análisis. Los resultados indicaron que diferentes ajustes matemáticos deben ser utilizados y no solamente uno, pues podemos obtener una información más completa.

Palabras clave: crecimiento vegetal; adquisición de imagen; fenómica.

1. INTRODUCCIÓN

El movimiento vegetal ha sido algo ya estudiado por Darwin y otros científicos (1,2). Se pueden describir patrones diarios como resultado del reloj circadiano, así como de luz y temperatura, que modulan el movimiento y crecimiento vegetal (3–6). Sin embargo, hay otros procesos que dependen únicamente del fotoperiodo o termoperiodo. Todos estos fenómenos se han descrito con ajustes matemáticos simples como lineal, exponencial, etc (7).

Hoy en día es posible obtener datos fenotípicos a partir de la adquisición de imágenes. Dependiendo del fin que se quiera, se pueden usar diferentes tipos de cámaras, tales como cámaras 2D, 3D, monocromáticas, multiespectral o hiperespectrales (8). Además, es importante analizar previamente qué tipo de longitud de onda usar, la intensidad de la luz y el fondo a utilizar es mejor para lo que queremos captar (9).

En este trabajo, se analizó el crecimiento y movimiento en varias especies vegetales: *Antirrhinum majus*, *A. linkianum*, *Petunia x hybrida* and *Fragaria x ananassa*, las cuales tienen diferentes comportamientos en su crecimiento. Se estudió qué tipo de ajustes matemáticos se pueden realizar lineal, exponencial, logarítmico, polinomial o modelo aditivo generalizado (GAM) con el fin de obtener la mayor información posible.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se usaron 4 especies: *Antirrhinum* (10), *Petunia x hybrida* (11,12) y *Fragaria x ananassa* (13), sometiénolas a tres 3 fotoperiodos distintos Luz/Oscuridad: 12/12, 24/0 y 0/24 h. La temperatura en la cámara de cultivo fue de 23/18 °C (día/noche), estudiando los parámetros de movimiento y crecimiento en *Antirrhinum* y en *Fragaria x ananassa*, y de ángulo y velocidad de movimiento en *Petunia x hybrida*.

2.2 Adquisición de imagen

La cámara de cultivo fue equipada con una cámara infrarroja para la adquisición de imagen y un Sistema de control para los periodos luz/oscuridad. Todo ello esta descrito con detalle previamente (14). Se tomaron imágenes con intervalos de 10 a 60 min (15).

2.3 Análisis de imagen

Una vez obtenidas las imágenes, se marcaron los puntos, gracias a los cuales después se podían obtener las longitudes o velocidades, dependiendo de si nos centramos en la distancia entre puntos (coordenadas) o cómo evoluciona un punto a lo largo de las imágenes, es decir, del tiempo. Por ello, cada imagen era una muestra. Las coordenadas obtenidas se transformaron en distancias y/o velocidades para su trabajo posterior.

Se utilizó R version 3.5.3 y diversas librerías y paquetes de este: “imager”; “bmp”; “ggplot2”; “readr”; “boot”; “mgcv”; “MetaCycle”; and “DescTools”.

2.4 Análisis estadístico

Los test estadísticos necesarios fueron desarrollados. En concreto, se realizó un ajuste de los datos para ajustarse a las siguientes líneas de tendencia: lineal, exponencial, logarítmico, polinomial y GAM. Además, se llevó a cabo el algoritmo JTK-Cycle, un algoritmo estadístico no paramétrico para identificar y caracterizar variables cíclicas en grandes bases de datos. Por último, se realizó el área bajo la curva, que se obtiene con la integral de la curva obtenida.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Habitualmente se han usado ajustes lineales y polinomiales para datos de crecimiento (16), en la mayor parte lineales (17). Sin embargo, modelos mixtos y otros no lineales pueden ser mejores cuando el crecimiento no es lineal (7,18).

Se analizó la velocidad de movimiento de *A. linkianum* y *A. majus* y se demostró que la curva GAM es la mejor opción. Además, se observa que el patrón es diferente en ambas plantas, pues *A. linkianum* llegó a alcanzar 1,5 cm/h. Sin embargo, el crecimiento no era diferente y era de unos 4 mm/d.

En cuanto al movimiento de la *Petunia*, este parece estar controlado por el fotoperiodo pues en condiciones de luz u oscuridad continua mantiene la posición y no se mueve, lo que se observa en la Tabla 1 al descartarse la presencia de un ciclo de luz-oscuridad diario. De igual forma, el mejor ajuste fue GAM. Sin embargo, los datos son muy relevantes, sobre todo para las transiciones entre luz y oscuridad. Además, se analizó para ver si había un ritmo, y se demostró que el

movimiento era cíclico cada 24 h (Tabla 1), lo que indica un ciclo de día/noche. Esto, en contraposición con *Arabidopsis* (19), el crecimiento y el movimiento no están ligados.

Por último, se analizó el tallo de las hojas de la fresa y crecían de forma similar independientemente del fotoperiodo al que se les expuso. La curva GAM mostraba la mejor precisión para el crecimiento, mientras que para el movimiento eran necesarios los datos crudos (es decir, aquellos obtenidos directamente de las imágenes sin ningún análisis estadístico posterior) para la mejor compresión de los datos debido a su continuo cambio de posición. El hecho de que el crecimiento no varíe, puede indicarnos que podríamos utilizarlo en futuros estudios pues se podría identificar el estado de crecimiento en el que se encontrase (20,21).

4. CONCLUSIONES

Es necesario buscar la apropiada curva de ajuste, dependiendo de lo que se quiera analizar. Esto permite comparar genotipos o condiciones de cultivo.

Usando el ajuste matemático, la información obtenida es mejor.

El mejor ajuste para el crecimiento es el GAM, mientras que, para el movimiento, la mejor opción son los datos crudos.

Los resultados de todas las plantas indican que es necesario un análisis exploratorio para determinar los patrones de crecimiento y movimiento.

5. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el BFU 2017-88300-C2-1-R de J.W. y M.E.C., BFU 2017-88300-C2-2-R de P.J.N., CDTI 5117/17CTA-P de M.E.C., P.J.N. y J.D.S.P.

6. REFERENCIAS

1. Darwin C. On the Movements and Habits of Climbing Plants. *Journal of the Linnean Society of London*. 1865;9(33-34):1-118.
2. Schaffner JH. Observations on the nutation of *Helianthus annuus*. *Botanical Gazette*. 1898;25(6):395-403.
3. Shim JS, Imaizumi T. Circadian clock and photoperiodic response in *Arabidopsis*: From seasonal flowering to redox homeostasis. *Biochemistry*. 2015;54(2):157-170.
4. Hecht V, Knowles CL, Schoor JKV, Liew LC, Jones SE, Lambert MJM, et al. Pea LATE BLOOMER1 is a GIGANTEA ortholog with roles in photoperiodic flowering, deetiolation, and transcriptional regulation of circadian clock gene homologs. *Plant Physiology*. 2007;144(2):648-61.
5. Annunziata MG, Apelt F, Carillo P, Krause U, Feil R, Koehl K, et al. Response of *Arabidopsis* primary metabolism and circadian clock to low night temperature in a natural light environment. *J Exp Bot*. 2018;69(20):4881-95.
6. Gould PD, Locke JCW, Larue C, Southern MM, Davis SJ, Hanano S, et al. The molecular basis of temperature compensation in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell*. 2006;18(5):1177-87.
7. Paine CET, Marthews TR, Vogt DR, Purves D, Rees M, Hector A, et al. How to fit nonlinear plant growth models and calculate growth rates: an update for ecologists. *Methods in Ecology and Evolution*. 2012;3(2):245-56.
8. Li L, Zhang Q, Huang D. A review of imaging techniques for plant phenotyping. *Sensors*. 2014;14(11):20078-111.
9. Perez-Sanz F, Navarro PJ, Egea-Cortines M. Plant phenomics: an overview of image acquisition technologies and image data analysis algorithms. *GigaScience*. 2017;6(11):1-18.
10. Ruiz-Hernández V, Hermans B, Weiss J, Egea-Cortines M. Genetic analysis of natural variation in antirrhinum scent profiles identifies benzoic acid carboxymethyl transferase as the major locus controlling methyl benzoate synthesis. *Frontiers in plant science*. 2017;8:27.
11. Koes R. Evolution and development of virtual inflorescences. *Trends in plant science*. 2008;13(1):1-3.
12. Bombarely A, Moser M, Amrad A, Bao M, Bapaume L, Barry CS, et al. Insight into the evolution of the Solanaceae from the parental genomes of *Petunia hybrida*. *Nature plants*. 2016;2(6):16074.

13. Shulaev V, Sargent DJ, Crowhurst RN, Mockler TC, Folkerts O, Delcher AL, et al. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nature genetics*. 2011;43(2):109.
14. Navarro P, Fernández C, Weiss J, Egea-Cortines M. Development of a configurable growth chamber with a computer vision system to study circadian rhythm in plants. *Sensors*. 2012;12(11):15356–75.
15. Valverde F, Mouradov A, Soppe W, Ravenscroft D, Samach A, Coupland G. Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science*. 2004;303(5660):1003–6.
16. Leister D, Varotto C, Pesaresi P, Niwergall A, Salamini F. Large-scale evaluation of plant growth in *Arabidopsis thaliana* by non-invasive image analysis. *Plant Physiology and Biochemistry*. 1999;37(9):671-8.
17. Golzarian MR, Frick RA, Rajendran K, Berger B, Roy S, Tester M, et al. Accurate inference of shoot biomass from high-throughput images of cereal plants. *Plant Methods*. 2011;7(1):2-2.
18. Chen D, Neumann K, Friedel S, Kilian B, Chen M, Altmann T, et al. Dissecting the Phenotypic Components of Crop Plant Growth and Drought Responses Based on High-Throughput Image Analysis. *The Plant Cell*. 2014;26:4636-55.
19. Dornbusch T, Michaud O, Xenarios I, Fankhauser C. Differentially phased leaf growth and movements in *Arabidopsis* depend on coordinated circadian and light regulation. *Plant Cell*. 2014;26(10):3911–21.
20. Harmer SL, Brooks CJ. Growth-mediated plant movements: hidden in plain sight. *Current opinion in plant biology*. 2018;41:89–94.
21. Bastien R, Meroz Y. The Kinematics of Plant Nutation Reveals a Simple Relation between Curvature and the Orientation of Differential Growth. *PLoS Comput Biol*. 2016;12(12):e1005238. <http://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1005238>.

Tabla 1. Análisis de parámetros circadianos del movimiento de *Petunia hybrida* Mitchel usando MetaCycle.

Fotoperiodo	Periodo (h)	p-valor ajustado
12/12 h L/D	26	0,0461
24 h light	26	0,6317
24 h dark	24	1

Influence of feedstock and additives in 23 added-value composts as a component of the growing media with *Pythium irregulare* suppressivity

Influencia de materia prima y aditivos en 23 compost de valor agregado como componente de los medios de cultivo con supresividad frente a *Pythium irregulare*

A. Hernández-Lara*, M. Ros, J.A. Pascual

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

*ahernandez@cebas.csic.es

Abstract

In the last years, alternative materials as partial or total growing media to peat with certain added-value functions such as the phytopathogen suppression, as well as biostimulant and/or biofertilizing activity, have been proposed. The aim of this work was to evaluate twenty-three agro-industrial composts as partial component of growing media on the growth of baby-leaf lettuce infected by *Pythium irregulare*. The composts were produced by mixing different feedstocks and different additives at the starting of maturation phase. The physico-chemical characterization indicated that the composts showed an adequate maturity degree and they could be used as growing media. The fresh lettuce weight after harvesting grown and the suppressivity with compost treatments were significantly higher compared to peat, composts with coffee showing the highest biomass as additive.

Keywords: suppressiveness effect; baby-leaf lettuce; compost.

Resumen

En los últimos años, se han propuesto materiales alternativos como medio de crecimiento para la turba con ciertas funciones de valor agregado, como la supresión de fitopatógenos, así como la actividad bioestimulante y/o biofertilizante. El objetivo de este trabajo fue evaluar veintitrés compostas agroindustriales como un componente parcial de los medios de crecimiento en el crecimiento de lechugas de hoja infectadas por *Pythium irregulare*. Los compost se produjeron mezclando diferentes materias primas y diferentes aditivos al comienzo de la fase de maduración. La caracterización fisicoquímica indicó que los compost mostraban un grado de madurez adecuada y podían usarse como medios de cultivo. El peso de la lechuga fresca después de la cosecha y la supresividad con los tratamientos con compost fueron significativamente mayor en comparación con la turba, siendo el café como aditivo el que mayor biomasa mostró.

Palabras clave: efecto supresivo; lechuga baby-leaf; compost.

1. INTRODUCTION

La turba es el principal medio de cultivo utilizado en la producción de cultivos vegetales debido a sus características agronómicas. Las turberas están bajo la protección de la Directiva 92/43/CE para hábitats naturales de fauna y flora silvestres, debido a los problemas ambientales derivados de la extracción de turba, por lo que el uso de turba debería reducirse y buscar

alternativas (1). El compost puede ser un material alternativo a la turba y su uso trae innumerables beneficios. Convierte los desechos o subproductos en un recurso que puede usarse como medio de cultivo en la producción de cultivos de hortalizas. Los residuos de la industria agroalimentaria pueden ser un buen punto de partida, ya que se caracterizan por ser una fuente limpia y segura para la producción de compost (2).

Además, los composts pueden mostrar cierta actividad supresora contra diferentes patógenos, así como una posible capacidad bioestimulante y biofertilizante, a diferencia de la turba (1). Se han obtenido medios de cultivo exitosos con materias primas específicas para la producción de compost. La supresión de enfermedades se atribuye principalmente a la población microbiana vinculada a la fuente de materia orgánica en el compost a partir de materiales de alimentación o aditivos (3).

La supresión en los compost depende del microbioma del compost y están asociados con diferentes mecanismos, la competencia, la antibiosis, el hiperparasitismo y la inducción de resistencia sistémica en la planta huésped (4). Es notable la incidencia de diferentes especies de *Pythium* sp. que causan estrechamiento del cuello de la planta y reducciones significativas en el crecimiento de la planta, siendo la lechuga el cultivo más afectado por dicho patógeno. Se ha demostrado que el compost con aditivos tiene más beneficios en los cultivos que el compost sin aditivos (3).

El objetivo de este trabajo fue evaluar 23 compost de la agroindustria como parte de los medios de cultivo para el cultivo de lechuga baby bajo del patógeno *Pythium irregulare*, atendiendo a la influencia de la combinación de materia prima específica y aditivo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Desarrollo del compostaje

Se seleccionaron 23 compost, que se obtuvieron combinando diferentes dosis de materias primas provenientes de desechos agroindustriales (tomate, puerro, alperujo y poda de viñedos) y aditivos como (café, tomillo, lavanda y jara), agregados en el comienzo de la fase de maduración. Las pilas de compostaje al aire libre (10 m³) se ubicaron en la Universidad Miguel Hernández (Orihuela, Alicante, España).

2.2 Métodos microbiológicos y analíticos

Se midieron los siguientes parámetros: pH, conductividad eléctrica (CE), N total, C total, el índice de germinación con *Lepidium sativum* L. (GI) y las unidades formadoras de colonias (UFC) tanto de hongos como de bacterias

2.3 Evaluación del compost como componente de los medios de cultivo supresor contra *Pythium irregulare* en cámara de cultivo

Cada compost se mezcló con turba en la proporción 3:1, utilizando la turba sin compost como tratamiento control. La variedad de lechuga seleccionada fue *Lactuca sativa* L. y *P. irregulare* como fitopatógeno para evaluar la supresión del compost. Las lechugas se recolectaron 25 d después de la siembra. Midiendo el índice de germinación (%), el índice de supresión (%) y peso fresco de las plantas.

2.4 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el software IBM Statistics SPSS 23.0. Realizando un test ANOVA para analizar los parámetros estudiar. El análisis de componentes principales (PCA) se realizó mediante el paquete FactorMineR (6) y el biplot fue representado por el paquete Factorextra (7).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los compost mostraron una madurez adecuada para su uso como medio de cultivo. Parámetro como el pH y CE que influyen en la germinación y el crecimiento de la planta fueron adecuados (8,9). Los compost mostraron entre 22,5-36,1 g kg⁻¹ de N total (datos no mostrados). El compost con residuos de café mostró el contenido en N total más alto. Nuestros resultados nos desvelan que los compost son adecuados como medios de cultivo (8,9). Además, el IG de Zucconi nos indica que los composts se encuentran libres de toxicidad (5) y que incluso los valores de algunos por encima del 100 % indican presencia de compuestos bioestimulantes.

Con la presencia de *P. irregulare*, la biomasa de lechuga fue mayor en medios de cultivo con compost, en comparación con turba, siendo el aditivo café el que presentó valores más altos. Los medios de cultivo con compost mostraron un mayor índice de supresión contra *P. irregulare* en comparación con la turba (Fig. 1). La inclusión de aditivos aumento la supresión del compost contra *P. irregulare*, lo que podría atribuirse a compuestos específicos introducidos con los aditivos. Los residuos de tomillo y café son ricos en compuestos fenólicos con efecto antimicrobiano y compuestos volátiles que muestran un efecto antimicrobiano (10).

El PCA reveló que los compost se pueden agrupar de acuerdo al aditivo. Los que mostraron una mayor relación fueron lavanda, tomillo y jara (Fig. 2). Los aditivos proporcionarían un valor agregado al compost en términos de mayor supresión y un mayor efecto bioestimulante.

4. CONCLUSIONES

Los compost agroindustriales como sustitutos parciales de la turba en medios de cultivo proporcionaron una mayor biomasa y mostraron un efecto supresor sobre *P. irregulare*, siendo los aditivos los que mayor supresividad mostraron. Es más adecuado asumir la pérdida potencial como consecuencia de los aditivos que estarían en el rango 10-20 %, que arriesgarse a que el cultivo infecte con un patógeno donde las pérdidas alcanzarían el 75 %, como se observa en nuestro ensayo.

5. AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio de Economía, Industria y Competitividad por la financiación recibida para llevar a cabo el proyecto AGL 2017-84085-C3-1-R.

6. REFERENCIAS

1. Blaya J, Lloret E, Ros M, Pascual JA. 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*. 2015;95(7):1482-90.
2. Morales AB, Ros M, Ayuso LM, Bustamante M de los A, Moral R, Pascual JA. Agroindustrial composts to reduce the use of peat and fungicides in the cultivation of muskmelon seedlings. *J Sci Food Agric*. 2017;97(3):875-81.
3. Modderman C. Composting with or without additives. *Anim Manure Prod Charact Environ Concerns, Manag*. 2020;67:245-54.
4. Pascual JA, Hernandez T, Garcia C, De Leij F, Lynch JM. Long-term suppression of *Pythium ultimum* in arid soil using fresh and composted municipal wastes. *Biol Fertil Soils*. 2000;30(5-6):478-84.
5. Zucconi F, Pera A, Forte M, Bertoldi M. Evaluating toxicity of immature compost. *BioCycle*. 1981;22 (2), 54-57.
6. Lê S, Josse J, Husson F. FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *J Stat Softw*. 2008;25(1):1-18.

7. Kassambara A, Mundt F. Factoextra: extract and visualize the results of multivariate data analyses. R Packag version. 2017;1(4):2017.
8. Morales AB, Bustamante MA, Marhuenda-Egea FC, Moral R, Ros M, Pascual JA. Agri-food sludge management using different co-composting strategies: study of the added value of the composts obtained. J Clean Prod. 2016;121:186–97.
9. Chowdhury AKMMB, Michailides MK, Akratos CS, Tekerlekopoulou AG, Pavlou S, Vayenas D V. Composting of three phase olive mill solid waste using different bulking agents. Int Biodeterior Biodegradation. 2014;91:66–73.
10. Turgut AC, Emen FM, Canbay HS, Demirdöğen RE, Çam N, Kılıç D, et al. Chemical characterization of *Lavandula angustifolia* Mill. which is a phytocosmetic species and investigation of its antimicrobial effect in cosmetic products. J Turkish Chem Soc Sect A Chem. 2017;4(1):283–98.

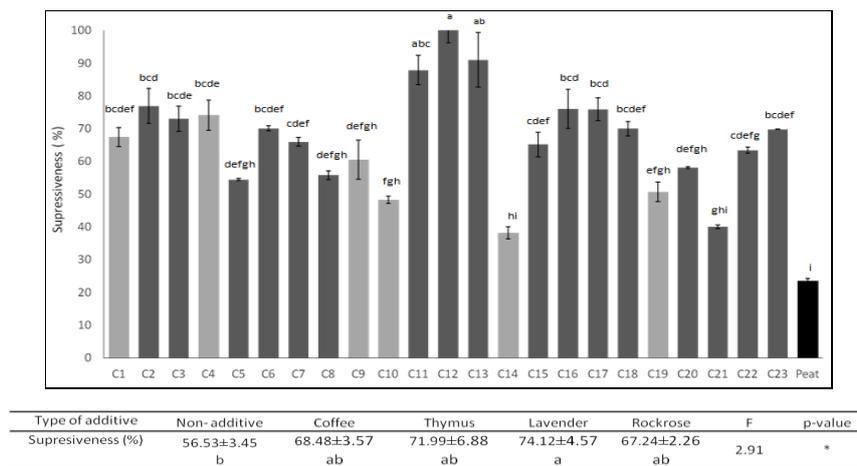


Figura 1. Índice de supresividad. C1: poda, tomate, puerro; C2: poda, tomate, puerro, café; C3: poda, tomate, puerro, jara; C4: poda, tomate; C5: poda, tomate, café; C6: poda, tomate, tomillo; C7: poda, tomate, lavanda; C8: poda, tomate, jara; C9: poda, puerro; C10: poda, puerro, alpeorujó; C11: poda, puerro, alpeorujó, café; C12: poda, puerro, alpeorujó, tomillo; C13: poda, puerro, alpeorujó, lavanda; C14: poda, tomate, alpeorujó; C15: poda, tomate, alpeorujó, café; C16: poda, tomate, alpeorujó, tomillo; C17: poda, tomate, alpeorujó, lavanda; C18: poda, tomate, alpeorujó, jara; C19: poda, tomate, puerro, alpeorujó; C20: poda, tomate, puerro, alpeorujó, café; C21: poda, tomate, puerro, alpeorujó, tomillo; C22: poda, tomate, puerro, alpeorujó, lavanda; C23: poda, tomate, puerro, alpeorujó, jara.

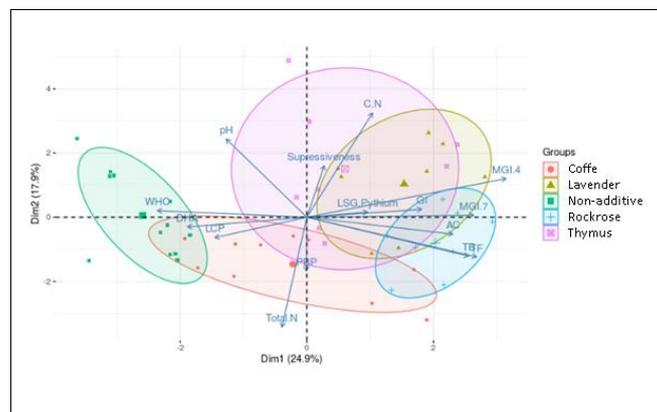


Figura 2. Biplot de Análisis de componentes Principales (PCA) de las diferentes propiedades de los compost.

Long-term impact of sustainable land management practices on soil bacterial community in an almond orchard in south Spain

Impacto a largo plazo de prácticas de manejo sostenible del suelo en la comunidad bacteriana edáfica de un cultivo de almendros en el sur de España

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

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

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

*onurcan.ozbolat@edu.upct.com

Abstract

A healthy bacterial community structure is one of the main aspects of soil quality indicators. Modern agricultural practices, where intense tillage and chemical fertilizers are applied, continue to put environmental balance and sustainability of production at stake day by day. In this study, we aimed to assess the long-term effect of low-input sustainable practices such as reduced tillage and green manure on soil bacterial communities in an almond orchard from south Spain. Reduced tillage and addition of green manure has shown the most stable bacterial community structure and species abundance with respect to conventional practice. Soil organic carbon and bacterial community are improved by low-input sustainable approach.

Keywords: 16S rRNA; soil bacteria; biodiversity; low-input farming; next generation sequencing.

Resumen

Una estructura de comunidad bacteriana saludable es uno de los principales indicadores de calidad del suelo. Las prácticas agrícolas modernas en las que se aplican labranza intensa y fertilizantes químicos continúan poniendo en juego el equilibrio ambiental y la sostenibilidad de la producción día a día. En este estudio, nuestro objetivo fue evaluar el efecto a largo plazo de prácticas sostenibles de bajos insumos, como la labranza reducida y el abono verde sobre la comunidad bacteriana edáfica en un cultivo de almendros del sur de España. La labranza reducida y la adición de abono verde han demostrado la estructura de la comunidad bacteriana más estable y la abundancia de especies con respecto a los métodos convencionales. El carbono orgánico del suelo y la comunidad bacteriana se mejoran con un enfoque sostenible de bajos insumos.

Palabras clave: 16S ARN; bacteria; biodiversidad; agricultura bajos insumos; secuenciación.

1. INTRODUCTION

Bacteria plays many crucial roles in soil dynamics such as regulation of macro biogeochemical cycles, nutrient cycling activities in terms of carbon and nitrogen ions along with degradation and decomposition of organic and inorganic matter (1). For any given crop field, the balance between soil carbon and free nitrogen ions are main aspects of healthy and productive

farming. Bacterial species regulate the availability and cycling of carbon and nitrogen ions in soil and bacterial population abundance and optimal biodiversity among species are one of the main soil quality indicators up to date (2).

Increasingly in the global scale, conventional way of agriculture has become highly mechanized and environmentally harmful. The non-sustainable practices have started to break the supply of key ecosystem services between crops and soil quality (3). Without these ecosystem services, modern agriculture has become dependent on off-farm inputs such as high tillage, chemical fertilizers which creates a negative loop for further biodiversity and soil quality reduction (4).

Sustainable land management practices such as reduced tillage and cover crops are proven to be contributing to prevent soil loss, organic carbon and other nutrient losses. Reduced tillage have long term positive effects on conserving soil quality and ecological and economical drawbacks of erosion and quality loss (5). Additionally by using reduced tillage and green manure systems, an increase of final product along with the necessity of fertilizers may be reduced/removed (3,5). Green manure application in soil is proven to improve hydraulic properties of the soil, increasing macroporosity and hydraulic conductivity, and elevating various aspects of soil quality (6).

The objective of this study was to assess the long term effect of low-input sustainable practices such as reduced tillage and green manure on soil bacterial communities in an almond orchard from south Spain.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Experimental setup

The study area was located in an almond orchard (*Prunus dulcis*) in Alhagüeces, Region of Murcia (35° 57' 31''N, 0° 56' 17''W). Experimental area consists of 53 trees (0.05 ha) representing a total area of 1.40 ha. The area has 17.5 °C of mean annual temperature and 280 mm of mean annual precipitation. The experimental strategy was set up in 2009, where three different treatments were established in triplicate: i) almond monocrop with intense tillage (chisel ploughing 4-5 times yr⁻¹ at 20 cm) (AIT); ii) almond monocrop with reduced tillage (chisel ploughing 2 times yr⁻¹ at 20 cm) (ART); and iii) almond orchard with reduced tillage diversified with *Avena sativa* & *Vicia sativa*(1:3 at 150 kg ha⁻¹) applied to soil as green manure (AVV).

2.2 Soil sampling and analyses

Soil was sampled in November 2019 at 0-10 cm depth. Five composite random samples were collected per treatment. Samples were kept in cooler with ice using sterile bags and taken to the laboratory, sieved <2 mm and kept at -20 °C until DNA isolation. DNA extraction from soil was carried out by using DNeasy PowerSoil Kit, QIAGEN. Assignments of purity and concentration values were done by using NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer and by using Qubit® 2.0 Fluorometer combined with Qubit dsDNA HS Assay Kit, respectively. Amplification of 16S hypervariable regions was carried out by using, Ion 16S™ Metagenomics Kit, ThermoFisher Scientific. Agilent 2100 Bioanalyzer® instrument used to evaluate concentrations and purity with the suitable Agilent High Sensitivity DNA Kit. Library preparation process was carried out by using Ion Xpress™ Plus gDNA Fragment Library Preparation Kit, ThermoFisher Scientific combined with Ion Xpress™ Barcode Adapters kit, ThermoFisher Scientific. Prepared library amplicons were processed for template preparation by using Ion Sphere™ Particles (ISPs) via Ion OneTouch™ 2 System with suitable Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 Kit, ThermoFisher followed by the enrichment process using Ion OneTouch™ ES. Sequencing was carried out by Ion PGM™ System, Ion PGM™ Torrent Server and suitable Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing kit in competence with

sequencing chips, Ion 316™ Chip v2 kit. Soil organic carbon (SOC) was determined by an elemental CHNS-O analyzer (EA-1108, Carlo Erba) with air-dried soil samples, sieved at < 2 mm and ground.

Raw sequencing results were processed through bioinformatics analyses to identify bacterial groups and families present in each sample. The process consisted of creating Operational Taxonomic Unit (OTU) tables by using the software QIIME™. Overall results were obtained by comparing the OTU tables against SILVA™ online database via QIIME. A One-way ANOVA with Tukey's post hoc at $P < 0.05$ was performed to assess differences among treatments. Principle co-ordinate analysis (PCoA) was conducted to assess the structure of bacterial community in the different treatments.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Total DNA and SOC followed the same trend, with increasing values as AIT<ART<AAV, however, differences were not significant (Table 1). These results show the increasing trend in soil organic matter and the abundance of microorganisms when applying reduced tillage and addition of green manure, as previously reported in other studies (7–9). According to the bacterial Shannon index, which is considered an indicator of species diversity, no significant differences were observed among treatments (Fig. 1). So, the different long-term practices have not led to changes in soil bacterial biodiversity. The reason for this finding might be that although less intense, all systems causes soil disturbance by tillage, and so biodiversity remains almost intact (10,11). According to a PCoA analysis (Fig. 2), the composition of the bacterial community was different between all treatments. AAV and ART clustered closer, indicating that reduced tillage has selected a specific microbial community different to that present when tillage frequency is higher, and so, more adapted to perturbations. Thus, reduced tillage showed lower bacterial diversity than intense tillage, yet the community structure is more similar to that where green manure is used and the microbial abundance is higher. In addition, although no differences in Shannon index was detected, the bacterial community structure is different among treatments, suggesting that biodiversity indices may not be suitable to assess the efficiency of management practices in agricultural soils.

4. CONCLUSIONS

Reduced tillage and addition of green manure are increasing soil organic matter, associated to higher microbial abundance and changes in the bacterial community structure compared to the conventional almond monocrop with intense tillage. The use of *A. sativa* and *V. sativa* contributed to the highest soil organic matter, microbial abundance and bacterial diversity. Even though the biodiversity and organic carbon values are not significantly different among treatments, green manure addition is showing a positive trend to improve bacterial community stability and abundance.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was conducted as a part of the European Commission Horizon 2020 project Diverfarming [grant agreement 728003].

6. REFERENCES

1. Smith P, Cotrufo MF, Rumpel C, Paustian K, Kuikman PJ, Elliott JA, et al. Biogeochemical cycles and biodiversity as key drivers of ecosystem services provided by soils. SOIL. 2015;1(2):665-85.

2. Wagg C, Bender SF, Widmer F, van der Heijden MGA. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(14):5266-70.
3. Almagro M, de Vente J, Boix-Fayos C, García-Franco N, Melgares de Aguilar J, González D, et al. Sustainable land management practices as providers of several ecosystem services under rainfed Mediterranean agroecosystems. *Mitig Adapt Strateg Glob Chang*. 2016;21(7):1029-43.
4. DeFries RS, Rudel T, Uriarte M, Hansen M. Deforestation driven by urban population growth and agricultural trade in the twenty-first century. *Nat Geosci*. 2010;3(3):178-81. <https://doi.org/10.1038/ngeo756>
5. Martínez-Mena M, Carrillo-López E, Boix-Fayos C, Almagro M, García Franco N, Díaz-Pereira E, et al. Long-term effectiveness of sustainable land management practices to control runoff, soil erosion, and nutrient loss and the role of rainfall intensity in Mediterranean rainfed agroecosystems. *Catena*. 2020;187:104352. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2019.104352>
6. Almagro M, Garcia-Franco N, Martínez-Mena M. The potential of reducing tillage frequency and incorporating plant residues as a strategy for climate change mitigation in semiarid Mediterranean agroecosystems. *Agric Ecosyst Environ*. 2017;246:210-20.
7. Rasmussen PE, Collins HP. Long-term impacts of tillage, fertilizer, and crop residue on soil organic matter in temperate semiarid regions. *Adv Agron*. 1991;45:93-134.
8. Elfstrand S, Hedlund K, Mårtensson A. Soil enzyme activities, microbial community composition and function after 47 years of continuous green manuring. *Appl Soil Ecol*. 2007;35(3):610-21. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929139306002125>
9. Kihara J, Martius C, Bationo A, Thuita M, Lesueur D, Herrmann L, et al. Soil aggregation and total diversity of bacteria and fungi in various tillage systems of sub-humid and semi-arid Kenya. *Appl Soil Ecol*. 2012;58:12-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.03.004>
10. Kuntz M, Berner A, Gattinger A, Scholberg JM, Mäder P, Pfiffner L. Influence of reduced tillage on earthworm and microbial communities under organic arable farming. *Pedobiologia (Jena)*. 2013;56(4-6):251-60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pedobi.2013.08.005>
11. Sun R, Li W, Dong W, Tian Y, Hu C, Liu B. Tillage Changes Vertical Distribution of Soil Bacterial and Fungal Communities. *Front Microbiol*. 2018;9:699. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29686662>

Table 1. Total DNA content and soil organic carbon (SOC) in the different treatments. Values are mean±standard error (n=5)

	AIT	ART	AAV	F-ANOVA
DNA (ng g⁻¹)	6012.31±4.20	6136.47±1.81	8756.14±6.57	0.025 not significant
SOC (g kg⁻¹)	17.28±0.81	18.12±0.26	19.08±0.92	0.058 not significant

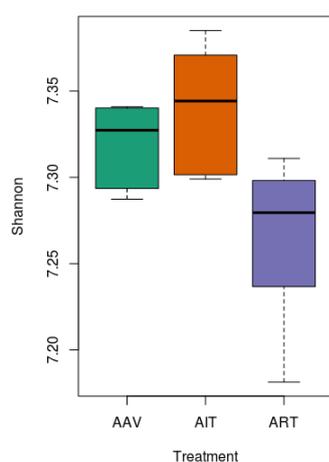


Figure 1. Shannon index of bacterial communities for each plot type prepared using the rarefied table with minimum number of reads and Shannon (vegan package) values.

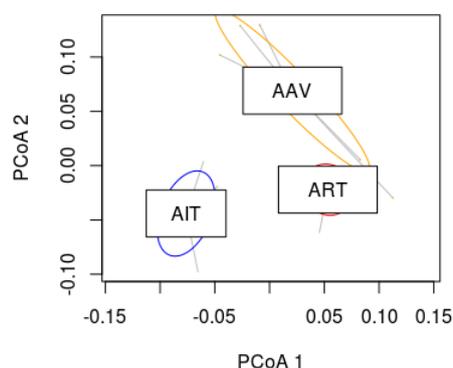


Figure 2. Principle co-ordinate analysis (PCoA) of bacterial communities by using bray method. Axis of PCoA 1 and PCoA 2 indicates bacterial abundance (numerical) and composition (coloured shapes).

A new patented portable weighing lysimeter for horticultural crops supervision

La patente de un nuevo lisímetro de pesada transportable para la supervisión de cultivos hortícolas

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

¹Grupo de Investigación de Ingeniería Agromónica y del Mar, Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT), Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena. Spain

²Departamento de Estructuras, Construcción y Expresión Gráfica, UPCT, C/ Doctor Fleming, s/n, 30202 Cartagena. Spain

*juan.nicolas@upct.es

Abstract

In semi-arid regions it is of great importance to know exactly the water and nutrient requirements of horticultural crops. Its knowledge prevents the inefficiency in water use and the contamination of soils, water and crops. A patent of a new portable weighing lysimeter is presented, whose originality comes from its remarkable shape and from its integration into horticultural crops. The complete portable weighing lysimeter consists of several connected modules improving its outputs. After a brief presentation of the state of the art, the new patented lysimeter is described and the modules are shown. A set of agricultural devices have been collected oriented to evaluate the water balance and the soil nutrients. The patented device allows the determination of the water balance, the remote supervision of the crop and a customized evaluation of the soil nutrients of interest to the user.

Keywords: water resources; precision agriculture; soil nutrients; design.

Resumen

En las regiones semiáridas es de gran importancia conocer con exactitud los requerimientos de agua y nutrientes de los cultivos hortícolas, evitando la ineficiencia en el uso del agua y la contaminación de suelos, aguas y cultivos. Se presenta la patente de un nuevo de lisímetro de pesada transportable, cuya originalidad radica en sus reducidas dimensiones para su integración en cultivos hortícolas. El nuevo lisímetro de pesada transportable consta de varios módulos que permiten mejorar sus prestaciones. Tras una breve presentación del estado del arte, se describe el nuevo lisímetro patentado y se explican los diferentes módulos. En él se unifican un conjunto de dispositivos agrícolas orientados a evaluar el balance hídrico y los nutrientes del suelo. El dispositivo patentado permite la determinación del balance hídrico, la supervisión remota del cultivo y una evaluación personalizada de los nutrientes del suelo de interés para el usuario.

Palabras clave: recursos hídricos; agricultura de precisión; nutrientes del suelo; diseño.

1. INTRODUCCIÓN

En regiones semiáridas, la determinación de las necesidades hídricas de los cultivos y sus nutrientes es de una gran importancia. Una correcta gestión del agua y de los nutrientes mejora la eficiencia de los recursos hídricos y evita la contaminación de suelos y aguas subterráneas (1).

Existen diversos dispositivos para estimar la evapotranspiración de un cultivo, entre los que destaca el lisímetro de pesada, al proporcionar los valores más precisos (2). No obstante, estos equipos suelen ser de grandes dimensiones y no incorporan sistemas para el análisis de los nutrientes del agua drenada o la supervisión remota del cultivo.

El objetivo de este trabajo es mostrar la patente realizada que solventa los inconvenientes anteriores, proporcionando una instalación ajustada al cultivo y una evaluación de sus necesidades hídricas y de nutrientes.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Sistema para el balance hídrico

Para la elaboración de la patente tuvo en cuenta lo expuesto en la patente ES2565127 (3), donde se muestra un dispositivo para la gestión del riego de plantas en maceta. Además, considerando los problemas de instalación de los lisímetros de pesada, se revisó el lisímetro propuesto por Dugas (4), utilizando una estructura externa de acero para la contención del terreno.

2.2 Sistema para el análisis de nutrientes

Existen soluciones que permiten reducir la cantidad de finos en el agua drenada mediante un filtro de decantación, constituido por un doble filtro de acero y cerámico para la retención de partículas en lisímetros (5). Además hay sistemas de control de riego con sensores para determinar la salinidad del agua drenada (6).

2.3 Sistema para la supervisión remota del cultivo

Se habían publicado diferentes artículos donde se definían nodos de visión artificial que podían incorporarse en la estructura, permitiendo la supervisión remota del cultivo y la monitorización de la evolución de su estado vegetativo (7,8).

3. RESULTADOS

El sistema constó de tres módulos (Fig. 1): A) Módulo para la determinación del balance hídrico mediante un sistema de contención del terreno, con un recipiente para el cultivo hortícola y un recipiente para la recogida de agua drenada. B) Módulo para la recogida del agua lixiviada del recipiente de cultivo con sondas para la medición en tiempo real de los nutrientes. C) Módulo de visión artificial para la supervisión remota del cultivo.

3.1 Sistema para el balance hídrico

El módulo estaba formado por un recipiente para la recogida de agua drenada procedente del recipiente de cultivo sostenido mediante un sistema de pesada en la estructura de contención del terreno (Fig. 1-A).

3.2 Sistema para el análisis de nutrientes

Los nutrientes de entrada y salida se medían mediante sensores incorporados en el equipo. El sistema permitía la extracción de muestras del agua lixiviada para la cuantificación del contenido de nitratos del suelo, el nivel de salinidad o el pH entre otros. Para la cuantificación de

los nutrientes, en el recipiente de cultivo se alojó un sensor de conductividad eléctrica que permitía evaluar la salinidad del suelo. Se acopló un recipiente modular con un conjunto de sondas con las que se analizaba de forma automatizada el agua, y unos tubos a través de los cuales se extraía el agua lixiviada del recipiente de muestras (Fig. 1-B). Todos los datos eran enviados a un *datalogger*.

3.3 Sistema para la supervisión remota del cultivo

El empleo de cámaras incorporadas al equipo permitía llevar a cabo la supervisión remota del cultivo. La estructura de soporte del nodo de visión artificial permitía la captura de imágenes del recipiente de cultivo (Fig. 1-C). Las imágenes eran enviadas a un sistema de adquisición de datos para la supervisión remota del cultivo, que comprendía algoritmos para conocer la profundidad radicular del cultivo.

Los datos se recogían en equipos electrónicos para el cálculo de la evapotranspiración y la gestión de los nutrientes mediante el control de electroválvulas. La unificación de estos sistemas mediante módulos acoplados dio como resultado la patente del trabajo: Sistema modular de gestión remota en tiempo real del estado vegetativo de los cultivos y del consumo de agua y nutrientes (9).

4. CONCLUSIONES

En esta comunicación se ha presentado un nuevo lisímetro de pesada transportable para la supervisión de cultivos hortícolas. La invención propuesta resuelve los inconvenientes de otros lisímetros tales como la contención del terreno, la incorporación de medios para supervisar los cultivos y la obtención de datos sobre los nutrientes del agua drenada, en función de las necesidades del usuario.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) para la realización de proyectos de investigación. Referencia: AGL2015-66938-C2-1-R. También se agradece la colaboración de la empresa TeleNatura EBT S.L.

6. REFERENCIAS

1. Ongley ED. Lucha contra la contaminación agrícola de los recursos hídricos (Estudio FAO Riego y Drenaje-55). GEMS/Water Collab Cent Canada Cent Int Waters. 1997;21-37.
2. López-Urrea R, Martín de Santa Olalla F, Fabeiro C, Moratalla A. Testing evapotranspiration equations using lysimeter observations in a semiarid climate. *Agric Water Manag.* 2006;85(1-2):15-26. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378377406000965>
3. García Fernández Pacheco D, Intrigliolo Molina DS, Molina Martínez JM, Ruiz Peñalver L. Sistema de cuantificación del balance hídrico para sistema de riego de plantas cultivadas en maceta. 2016. <http://hdl.handle.net/10317/5507>
4. Dugas WA, Upchurch DR, Ritchie JT. A Weighing Lysimeter for Evapotranspiration and Root Measurements 1. *Agron J.* 1985;77(5):821-5.
5. Inoue M, Shimizu T. Experimental set-up to continuously monitor water flow and solute transport in unsaturated large weighing lysimeters. *Res Pap Annu Rep Arid L Res Center, Tottori Univ.* 1997;1-14.
6. Rothem G. Apparatus for irrigating plants. WO 2010/143134 A1, 2010.
7. Esquivá JM, Oates M, García-Mateos G, Moros Valle B, Martínez J, Ruiz-Canales A. Development of a visual monitoring system for water balance estimation of horticultural crops using low cost cameras. *Comput Electron*

Agric. 2017;141:15–26.

8. González-Esquivá JM, García-Mateos G, Escarabajal-Henarejos D, Hernández-Hernández JL, Ruiz-Canales A, Molina-Martínez JM. A new model for water balance estimation on lettuce crops using effective diameter obtained with image analysis. *Agric Water Manag.* 2017;183:116–22. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378377416304620>
9. Molina Martínez JM, Nicolás Cuevas JA, Parras Burgos D, Ruiz Canales A. Sistema de Telegestión modular del estado vegetativo de cultivos y de su consumo de agua y nutrientes [Internet]. Oficina Española de Patentes y Marcas (OEPM); Número de publicación: 2 668 210 Número de solicitud: 201830216, 2018. <http://hdl.handle.net/10317/8605>

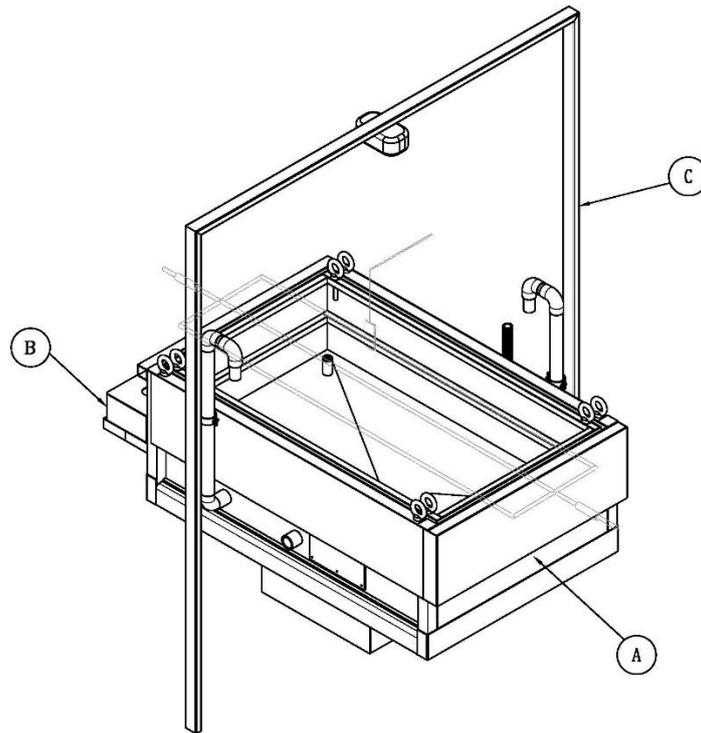


Figura 1. Vista ensamblada del lisímetro. A) Módulo para la determinación del balance hídrico. B) Módulo para la recogida del agua lixiviada del recipiente de cultivo C) Módulo de visión artificial para la supervisión remota del cultivo.

Effect and evolution of organic amendments application on the functionality of metallic mine tailings soils in environments under Mediterranean climate

Efecto y evolución de la adición de enmiendas orgánicas en la funcionalidad de suelos de depósitos de minería metálica en ambientes de clima Mediterráneo

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

Área de Edafología y Química Agrícola, Departamento de Ingeniería Agronómica, ETISA, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena. Spain.

*antonio.penalver@upct.es

Abstract

Metallic mine tailings present unfavorable soil conditions that hinder soil functionality and plant colonization. The aim of this study was to assess if the addition of organic amendments (compost of urban solid waste + biochar from pruning trees) improved the functionality of bare tailing soils under Mediterranean climate and favored spontaneous plant colonization. A series of soil parameters were seasonally evaluated after organic amendments addition during one year (e.g., pH, salinity, soluble organic carbon, soluble metals, carbon from microbial biomass and decomposition of organic matter). Organic amendments addition improved soil conditions. This enhanced soil microbial functionality, which persisted seasonally, and favored spontaneous plant colonization.

Keywords: mine wastes; soil biogeochemical cycles; soil functioning; soil ecology.

Resumen

Los depósitos de minería metálica presentan condiciones desfavorables que dificultan la funcionalidad del suelo y la colonización vegetal. El objetivo de este trabajo fue evaluar si la adición de enmiendas orgánicas (compost de residuos sólidos urbanos + biochar de restos de podas) mejora la funcionalidad de suelos desnudos de un depósito bajo clima Mediterráneo y si favorece la colonización espontánea de la vegetación. Se evaluaron diversos parámetros estacionalmente durante un año tras la adición de las enmiendas (p.e. pH; salinidad; carbono orgánico soluble; metales solubles; carbono de la biomasa microbiana y descomposición de la materia orgánica) La adición de enmiendas orgánicas mejoró las condiciones del suelo. Esto mejoró la funcionalidad microbiana del suelo, que persistió estacionalmente, y favoreció la colonización espontánea de la vegetación.

Palabras clave: residuos mineros; ciclos biogeoquímicos del suelo; funcionalidad del suelo; ecología de suelos.

1. INTRODUCCIÓN

Los depósitos de residuos de minería metálica presentan condiciones desfavorables para la biota edáfica (p.ej. pHs extremos, elevada salinidad, elevados niveles de metales, escasez de materia orgánica y nutrientes, etc.), dificultando, en la mayoría de casos, la colonización y el establecimiento de las plantas (1). Tales suelos sin vegetación presentan un elevado riesgo de erosión y, por consiguiente, suponen una fuente de contaminación para las zonas de alrededor

(1). Entre las distintas técnicas de remediación de estos ambientes se encuentra el fitomanejo (uso combinado de enmiendas y plantas) (2). La aplicación de enmiendas orgánicas (p.ej. compost, biochar) a los depósitos mineros puede llevar a un incremento del contenido de materia orgánica y nutrientes del suelo, lo que a su vez puede estimular la actividad microbiana (3) y mejorar, entre otros, la funcionalidad de estos ambientes. Los objetivos del presente trabajo fueron: i) evaluar si la adición de enmiendas orgánicas a un suelo desnudo de un depósito minero bajo condiciones de clima Mediterráneo semiárido conducía a una mejora de la funcionalidad edáfica y favorecía la colonización espontánea de plantas nativas de áreas circundantes; ii) evaluar si la mejora en la funcionalidad edáfica se mantenía estacionalmente.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se llevó a cabo en un depósito de residuos de minería metálica del antiguo distrito minero de La Unión-Sierra de Cartagena (SE de España). Se establecieron ocho parcelas de 4 m² en zonas desprovistas de vegetación. A inicios de 2017 todas las parcelas fueron labradas manualmente y, en cuatro de ellas, se adicionó una mezcla de compost de residuos sólidos urbanos (RSU) y biochar de restos de podas (13 y 65 t ha⁻¹, respectivamente) a una profundidad de ~10 cm. Se establecieron dos tratamientos (n=4): suelo sin adición de enmiendas (SE) y suelo con adición de enmiendas (E). Tras dos meses de adición de las enmiendas orgánicas se llevó a cabo un muestreo inicial de suelo para la caracterización de los tratamientos de estudio. A continuación, se realizó una monitorización estacional (verano, otoño e invierno de 2017 y primera de 2018) de determinados parámetros edáficos.

Inicialmente, en los suelos de cada tratamiento, se analizó el contenido de carbono orgánico total (COT) y nitrógeno total (NT) (analizador TOC-VCSH Shimadzu) y las concentraciones totales de metales (fluorescencia de rayos-X, analizador Bruker S4 Pioneer). Estacionalmente se analizaron los siguientes parámetros: pH, conductividad eléctrica (CE), carbono orgánico soluble (COS) (analizador TOC-VCSH Shimadzu), metales solubles (ICP-MS, Agilent 7500A), carbono de la biomasa microbiana (CBM) (4), y tasa de descomposición de bolsas de té (TBI) (5). Además, durante el periodo de estudio, se realizaron inventarios de vegetación en las parcelas de estudio.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La adición de las enmiendas orgánicas aumentó el contenido inicial de COT (significativamente) y NT del suelo, como era de esperar, y disminuyó la concentración de metales totales (significativamente para el Pb) (Tabla 1). Así mismo, la adición de las enmiendas orgánicas condujo a un aumento del pH y a una disminución de la salinidad del suelo, efectos que se mantuvieron en el tiempo (Tabla 2). El pH mostró variaciones significativas para ambos tratamientos relacionadas con cambios estacionales, observándose el valor más elevado para SE en primavera (~6,4) y en E en invierno (~8,0). La salinidad en E no mostró cambios estacionales mientras que en SE fue significativamente mayor en verano (~6,6 dS m⁻¹). La adición de las enmiendas orgánicas indujo un aumento inicial de la concentración de COS del suelo (SE ~18 mg kg⁻¹ vs. E~31 mg kg⁻¹) (Tabla 2). La concentración de COS en el tratamiento E tendió a disminuir tras el aumento inicial, alcanzando niveles similares al tratamiento SE en las dos últimas estaciones (~18-19 mg kg⁻¹ en invierno y ~10-11 mg kg⁻¹ en primavera). La concentración de metales solubles (Pb y Zn) disminuyó significativamente con la adición de las enmiendas al suelo (Tabla 2). Los valores más altos en E se encontraron para ambos en verano (Pb~41 y Zn~2200 µg kg⁻¹), mientras que en SE no hubo cambios significativos entre estaciones.

En relación al CBM y TBI (Fig. 1), se observaron diferencias significativas entre tratamientos y entre estaciones para ambos tratamientos. El mayor valor de CBM se observó en el tratamiento E en verano (~56 mg C kg⁻¹). Sin embargo, esta mayor presencia inicial de microorganismos no se

vio reflejada en una mayor TBI (~0,002). Las poblaciones microbianas presentes en las enmiendas pudieron tener mayor preferencia por el consumo de fuentes de carbono aportadas por las enmiendas y más fácilmente disponibles que las presentes en estos suelos. Sin embargo, con la disminución de estos recursos en el tiempo, las comunidades microbianas pudieron comenzar a consumir otro tipo de fuentes de carbono. Esto se reflejó en valores más elevados de TBI (~0,004-0,0134), incluso con valores de CBM más bajos que al inicio (~30 mg C kg⁻¹). Por otro lado, a partir de otoño, se registró la presencia de ejemplares de la especie vegetal *Zygophyllum fabago* en las parcelas con adición de las enmiendas.

4. CONCLUSIONES

La adición de enmiendas orgánicas mejoró las características físico-químicas de suelos sin vegetación de depósitos de minería metálica bajo condiciones de clima Mediterráneo semiárido. Dicha mejora indujo un aumento de la funcionalidad microbiana del suelo, persistente estacionalmente, además de favorecer la colonización espontánea de la vegetación.

5. AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad de España a través de fondos FEDER (Proyecto RESCLICONT- CGL2016-80981-R).

6. REFERENCIAS

1. Conesa HM, Schulin R. The Cartagena-La Unión mining district (SE Spain): A review of environmental problems and emerging phytoremediation solutions after fifteen years research. *J Environ Monit.* 2010;12(6):1225–33.
2. Burges A, Alkorta I, Epelde L, Garbisu C. From phytoremediation of soil contaminants to phytomanagement of ecosystem services in metal contaminated sites. *Int J Phytoremediat.* 2017;20(4):384–97.
3. Zama EF, Reid BJ, Arp HPH, Sun GX, Yuan HY, Zhu YG. Advances in research on the use of biochar in soil for remediation: a review. *J Soils Sediments.* 2018;18(7):2433–50.
4. Vance ED, Brookes PC, Jenkinson DS. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol Biochem.* 1987;19(6):703–7.
5. Keuskamp JA, Dingemans BJJ, Lehtinen T, Sarneel JM, Hefting MM. Tea Bag Index: A novel approach to collect uniform decomposition data across ecosystems. *Methods Ecol Evol.* 2013;4(11):1070–5.

Tabla 1. Caracterización inicial de los tratamientos de estudio (media±error estándar, n=4). Tratamientos: sin adición de enmiendas (SE); con adición de enmiendas (E). COT (carbono orgánico total). NT (nitrógeno total).

Parámetro	SE	E
COT (g kg ⁻¹)	2,72±0,17 *	39,7±10,2
NT (g kg ⁻¹)	0,31±0,08	0,55±0,09
Pb _{total} (mg kg ⁻¹)	5345±373 *	4099±299
Zn _{total} (mg kg ⁻¹)	8596±2213	6182±1168

*indican diferencias significativas entre tratamientos (t de Student, p<0,05).

Tabla 2. Evolución estacional de los parámetros de la solución edáfica (media±error estándar, n=4). Tratamientos: sin adición de enmiendas (SE); con adición de enmiendas (E). CE (conductividad eléctrica). COS (carbono orgánico soluble).

Parámetro	Tratamiento	verano	otoño	invierno	primavera
pH	SE	5,52±0,22 a	5,67±0,26 a	5,99±0,17 ab	6,37±0,35 b
	E	7,62±0,07 a*	7,86±0,10 b*	8,01±0,10 b*	7,70±0,07 ab*
CE (dS m ⁻¹)	SE	6,55±1,37 b	3,79±0,59 a	4,59±0,82 ab	6,28±1,29 ab
	E	3,92±0,48 a	2,71±0,20 a	2,88±0,25 a	2,81±0,27 a*
COS (mg kg ⁻¹)	SE	18,0±2,3 ab	11,9±0,9 a	18,8±1,8 b	10,9±3,0 a
	E	30,8±5,5 c	16,5±2,9 b	18,4±2,3 bc	9,9±1,1 a
Pb _{soluble} (µg kg ⁻¹)	SE	3755±1576 a	2092±823 a	2200±736 a	1891±1089 a
	E	41,1±8,1 b*	10,9±3,5 a*	19,6±5,1 ab*	13,6±1,4 a*
Zn _{soluble} (µg kg ⁻¹)	SE	206913±50067 a	103985±10104 a	106292±9217 a	119161±41229 a
	E	2172±1017 c*	1062±404 ab*	1499±733 bc*	576±253 a*

* Diferentes letras indican diferencias significativas entre estaciones para un tratamiento (ANOVA de medidas repetidas con test post-hoc de Bonferroni, p<0,05). * indica diferencias significativas entre tratamientos por estación (t de Student, p<0,05).

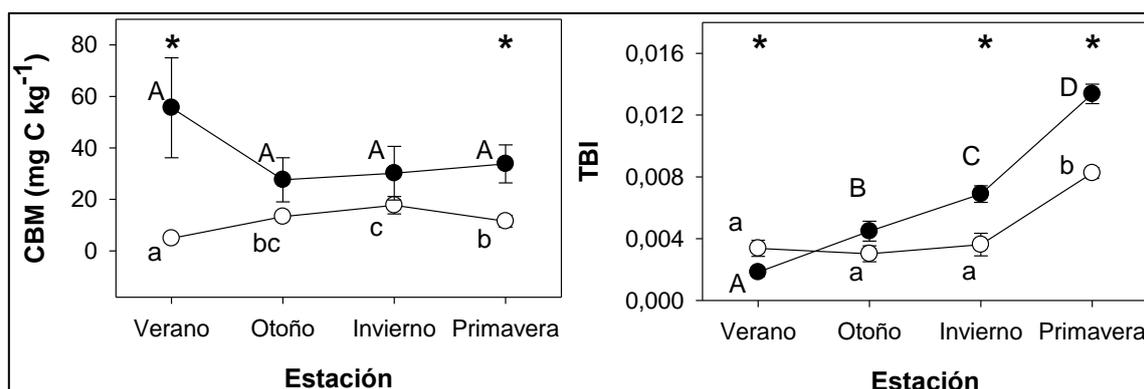


Figura 1. Evolución del carbono de la biomasa microbiana (CBM) e índice de las bolsas de té (TBI) (media±error estándar, n=4). Tratamientos: sin adición de enmiendas (SE, puntos blancos); con adición de enmiendas (E, puntos negros). * indica diferencias significativas entre tratamientos por estación (t de Student, p<0,05). Diferentes letras (minúscula para SE, mayúscula para E) indican diferencias significativas entre estaciones para un tratamiento (ANOVA de medidas repetidas con test post-hoc de Bonferroni, p<0,05).

POSTERS SESSION

Safe wastewater reuse in agriculture. Emerging contaminants and risk assessment

Reutilización segura de aguas residuales en agricultura. Contaminantes emergentes y evaluación de riesgos

D. Bañón*, L. Ponce, J.J. Alarcón

CEBAS-CSIC, Campus Universitario de Espinardo, 30100 Murcia. Spain.

*danielbanongomez@gmail.com

Abstract

The main objective of this thesis is to address the risks associated with the use of reclaimed water in agriculture in an integrated manner. Particularly, a comprehensive assessment of the presence, persistence and accumulation of the so-called pollutants of emerging concern in the water-soil-plant system will be carried out. For this purpose, real crops of high commercial interest, different working conditions (irrigation systems, type of substrates, etc.) will be selected, and specific analysis protocols will be proposed to assess the quality of the crops. The results obtained, together with additional protocols for microbiological studies and the evaluation of short- and long-term toxicological effects, will help to foresee future risk scenarios, and avoid problems in the soil-plant complex, guaranteeing high-quality agricultural production while protecting human health.

Keywords: agriculture; emerging contaminants; reclaimed water; risks assessment; water reuse.

Resumen

El objetivo principal de la tesis es abordar de manera integrada los riesgos asociados a la utilización de aguas regeneradas en agricultura. En concreto se realizará una evaluación exhaustiva de la presencia, persistencia y acumulación de los denominados contaminantes de preocupación emergente en el sistema agua-suelo-planta. Para ello, se seleccionarán cultivos reales de alto interés comercial, diferentes condiciones de trabajo (sistemas de riego, tipo de sustratos, etc.), y se propondrán protocolos de análisis específicos que permitirán evaluar la calidad de los cultivos. Los resultados obtenidos, junto con protocolos adicionales para estudios microbiológicos y la valoración de efectos toxicológicos a corto y largo plazo, permitirán prever futuros escenarios de riesgo y evitar problemas en el complejo suelo-planta, garantizando una producción agrícola de alta calidad, protegiendo además la salud humana.

Palabras clave: agua regenerada; agricultura; contaminantes emergentes; evaluación de riesgos; reutilización.

1. INTRODUCCIÓN

El estrés hídrico al que se enfrentan los diferentes países de la cuenca mediterránea es una evidencia. Los principales factores impulsores son el crecimiento de la población y unos estándares de vida más elevados, junto con la reducción de la disponibilidad de agua dulce debido a diversos problemas de contaminación y sequía (1). Una alternativa de gran interés para afrontar esta problemática reside en el aprovechamiento de aguas residuales procedentes de Estaciones Depuradoras (EDAR) (2).

El aprovechamiento de aguas residuales puede aliviar la alta necesidad de agua sobre todo en zonas de elevada producción agrícola, como es el caso de la Región de Murcia. Además de los múltiples beneficios para la actividad agrícola, las actividades de reutilización presentan otros beneficios ambientales y económicos como la reducción del aporte de contaminantes a cursos naturales de agua, regulación de caudales o aprovechamiento de elementos nutritivos contenidos en aguas residuales a modo de fertilizantes(3).

En la actualidad, la Región de Murcia es líder mundial en materia de tratamiento y depuración de aguas, así como del uso de agua regenerada en agricultura. De hecho, en esta región, el 99 % de las aguas residuales se depuran de forma adecuada y más del 90 % del volumen tratado se reutiliza para diversos fines. Sin embargo, existen diferentes riesgos que hay que contemplar, como la salinización a medio plazo del suelo por aporte continuado de concentración de sales, el aporte excesivo de nutrientes a los cultivos o la presencia de microorganismos patógenos y microcontaminantes(4).

La salinización secundaria del suelo afecta aproximadamente de 1 a 3 millones de ha en la UE, principalmente en los países mediterráneos, considerándose una de las principales causas de la desertificación. Por otra parte, en el agua regenerada puede haber presencia de microorganismos patógenos, por lo que es importante un control para minimizar los riesgos para la salud. Aunque en la legislación actual (Real Decreto 1620/2007) para la reutilización de aguas regeneradas en agricultura están contemplados algunos de ellos como *Escherichia coli* o nematodos intestinales, diversos autores sugieren contemplar además un análisis de riesgos microbiológicos para la elaboración de futuras leyes y directrices.

Entre los riesgos actuales derivados del uso de aguas regeneradas en agricultura que más preocupan a la comunidad científica figura la presencia los denominados "contaminantes de preocupación emergente" (CE). Estas sustancias se encuentran actualmente entre las líneas de investigación prioritarias de los principales organismos dedicados a la protección de la salud pública y medioambiental, como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Comisión Europea o las Agencias para la protección del Medio Ambiente, como la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU[5]. Aunque algunas de estas sustancias se encuentran enmarcadas en listas oficiales de observación (Directiva 2013/39/UE, Decisión de Ejecución 2015/495/UE o Decisión de Ejecución 2018/840/UE), no se encuentran reguladas principalmente debido al desconocimiento sobre los efectos a corto o largo plazo de estas sustancias sobre la salud humana y los diferentes ecosistemas.

Los CE comprenden una amplia gama de compuestos farmacéuticos y de cuidado personal, aditivos, agentes tensioactivos o microplásticos. Generalmente las EDAR no están diseñadas para la eliminación completa de este tipo de contaminantes, por lo que estos contaminantes se pueden introducir en el ciclo hidrológico alcanzando incluso la cadena alimentaria a través de vertidos medioambientales o mediante la utilización de aguas regeneradas en agricultura. Por tanto, hay una necesidad inminente de evaluar las fuentes, el destino y los efectos de este tipo de contaminantes en los seres humanos y los diferentes ecosistemas (6).

Otro riesgo añadido es la capacidad de ciertos CE para transformarse en determinados subproductos o productos de transformación (TPs, por sus siglas en inglés) en la mayoría de los casos desconocidos y con capacidad de ser altamente tóxicos. Por tanto, la identificación de TPs es una práctica cada vez más común, que permite un mayor conocimiento acerca de los mecanismos de reacción o la generación de productos refractarios o persistentes. Tanto la presencia de CE como de los correspondientes TPs presenta dificultades relacionadas con la gran cantidad de compuestos presentes en los diferentes compartimentos ambientales, las diferencias entre sus propiedades físico-químicas y el amplio intervalo de concentración a la que pueden encontrarse (7).

Una dificultad añadida al análisis de estas muestras es la gran variabilidad y complejidad de las matrices que hace necesario el establecimiento de protocolos de muestreo y análisis que permitan realizar un seguimiento sistemático de los diferentes ecosistemas (agua-suelo-planta) (8). Por esta razón se requiere desarrollar y aplicar diferentes tecnologías analíticas capaces de evaluar la presencia y concentración de dichos compuestos con alta sensibilidad. Para ello, la cromatografía líquida o gaseosa acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS, LC-Q-TOF-MS, o GC-MS) resultan herramientas de gran utilidad.

En general, la presencia de todos los riesgos descritos anteriormente, provoca una cierta desconfianza en agricultores y consumidores en cuanto a la calidad agronómica del agua regenerada, la posibilidad de efectos adversos a corto o largo plazo tanto en cultivos como en suelos agrícolas, o los perjuicios para la salud pública. Por lo tanto, para la preservación de una agricultura intensiva, rentable y respetuosa con el medio ambiente, se necesitan proyectos agrícolas innovadores con estudios multidisciplinares que incorporen tecnologías de vanguardia en la reutilización del agua (9), y estudios detallados acerca de la presencia, persistencia y acumulación de ciertos compuestos en los sistemas agua-suelo-planta, garantizando así una reutilización sin riesgos.

El objetivo principal de la tesis es abordar los riesgos asociados a la utilización de aguas regeneradas en agricultura. Para ello se realizará un seguimiento específico de la ruta y persistencia de ciertos CE y sus TPs en cultivos reales de alto interés comercial regados con aguas regeneradas, prestando especial atención al desarrollo y calidad de los cultivos. Para ello, se estudiarán diferentes escenarios (sistemas de regadío, sustratos, variabilidad de cultivos, etc.) y se establecerán protocolos de análisis específicos (procedimientos de extracción y técnicas analíticas combinadas) que permitan conocer la calidad del sistema agua-suelo-planta. Todo ello se complementará con análisis microbiológicos y protocolos de seguimiento de efectos tóxicos utilizando diferentes organismos de la cadena trófica.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos de campo se llevarán a cabo en una parcela experimental ubicada en el término municipal de Torre Pacheco (Murcia), dentro de la depuradora de Roldán-Lo Ferro-Balsicas. Dicha parcela está equipada con un invernadero de polietileno de 680 m² con una longitud de 38,4 m y una anchura de 18 m con ventilación tipo mariposa y un cabezal de riego independiente, desde el cual se maneja el control climático y la aplicación del fertirriego. Los datos climáticos se obtienen mediante la estación agroclimática propia situada en la parte superior del invernadero.

La caracterización físico-química de muestras (sistema agua-suelo-planta) se llevará a cabo en los laboratorios del CEBAS-CSIC y constará medidas como pH, conductividad eléctrica, sólidos disueltos totales (SDT), turbidez, concentración de macronutrientes (Na, K, Ca, Mg), micronutrientes (Fe, B, Mn), metales pesados (Ni, Cd, Cr, Cu, Pb, Zn) y aniones (cloruro, nitrato fosfato y sulfato) entre otras.

Para el seguimiento y evaluación de CE en el sistema agua-suelo-planta, así como el desarrollo de metodologías analíticas específicas para las diferentes matrices objeto de estudio, se utilizará la plataforma metabolómica de alimentos vegetales del CEBAS-CSIC, provista con un sistema UPLC/Q-TOF-MS.

3. RESULTADOS ESPERADOS

La reutilización de aguas residuales procedentes de EDAR para usos agrícolas es una alternativa que cada vez está tomando más relevancia en nuestra sociedad y especialmente en zonas con escasez de agua como la Región de Murcia. Sin embargo, el desarrollo de un programa

de reutilización de aguas residuales choca en ocasiones con la reticencia de los agricultores, y de la sociedad en general, por el desconocimiento que tiene su uso en la salud o el medio natural.

Con este estudio se pretende dar respuesta a las inquietudes e incógnitas de los usuarios, aportando datos científicos reales de gran interés. Los resultados obtenidos permitirán prever futuros escenarios de riesgo, evitando problemas potenciales en el complejo suelo-planta, garantizando así una producción agrícola de alta calidad, y protegiendo además la salud humana.

5. AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se desarrolla en el marco del proyecto RIS3MUR REUSAGUA, financiado por la Consejería de Empresa, Industria y Portavocía de la Región de Murcia, que se desarrolla en el marco del Programa Operativo Feder 2014-2020, y en el que se encuentran involucradas las siguientes entidades: CEBAS-CSIC, Imida, Esamur, UMU, UPCT, Cetenma, Azud, Hidrogea y Emuasa. El doctorando se encuentra financiado por un contrato predoctoral de la Fundación Séneca. Comunidad Autónoma de la Región de Murcia.

6. REFERENCIAS

1. Melgarejo J, Fernandez-Aracil P. Congreso Nacional del Agua Orihuela. Innovacion y Sostenibilidad. Universidad de Alicante; 2019.
2. Salgot M, Folch M. Wastewater treatment and water reuse. *Curr Opin Environ Sci Health*. 2018;2:64–74. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2018.03.005>.
3. Intriago JC, López-Gálvez F, Allende A, Vivaldi GA, Camposeo S, Nicolás EN, et al. Agricultural reuse of municipal wastewater through an integral water reclamation management. *J Environ Manage*. 2018;213:135–141.
4. Price DJ, Adams, Jr C. Water Use and Wastewater Management: Interrelated Issues with Unique Problems and Solutions. *Environmental and Health Issues in Unconventional Oil and Gas Development*, Elsevier; 2016:61–79. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804111-6.00005-4>.
5. Contaminants of Emerging Concern including Pharmaceuticals and Personal Care Products | Water Quality Criteria | US EPA n.d. <https://www.epa.gov/wqc/contaminants-emerging-concern-including-pharmaceuticals-and-personal-care-products> (accessed March 16, 2020).
6. Gogoi A, Mazumder P, Tyagi VK, Tushara Chaminda GG, An AK, Kumar M. Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review. *Groundwater for Sustainable Development*. 2018;6:169-80. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2017.12.009>.
7. Farré M la, Pérez S, Kantiani L, Barceló D. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC Trend Anal Chem*. 2008;27:991-1007. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.010>.
8. Oetjen K, Giddings CGS, McLaughlin M, Nell M, Blotvogel J, Helbling DE, et al. Emerging analytical methods for the characterization and quantification of organic contaminants in flowback and produced water. *Trends Environ Anal Chem*. 2017;15:12-23. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2017.07.002>.
9. Aragüés R, Urdanoz V, Çetin M, Kirda C, Daghari H, Ltifi W, et al. Soil salinity related to physical soil characteristics and irrigation management in four Mediterranean irrigation districts. *Agr Water Manage*. 2011;98:959-66. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2011.01.004>.

Inhibition of ethylene production in broccoli by essential oil vapors released from active packaging

Inhibición de la producción de etileno del brócoli mediante vapores de aceites esenciales de envases activos

A. Navarro-Martínez*, G.B. Martínez Hernández, A. López-Gómez

Grupo de Ingeniería del Frío y la Seguridad Alimentaria, Departamento de Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena. Spain.

*alejandra.navarro@upct.es

Abstract

Broccoli is an inflorescence whose useful life can be highly reduced during its post-harvest storage due to the high sensitivity of this Brassica to ethylene. The most obvious visual effect due to ethylene is the yellowing of this vegetable. The ethylene production in broccoli could be reduced with essential oils (EOs), even at low concentrations. In this Thesis, the effect of encapsulated essential oils (inclusion complexes formed with β -cyclodextrin) released from an active package will be studied on the ethylene production of broccoli. The expected results are: decrease of the ethylene production (understanding the gene expression of the key enzymes of the ethylene biosynthesis pathway) and extension of the broccoli shelf life with the active packaging with EOs.

Keywords: carvacrol; inclusion complex; quality; *Brassica oleracea* var. italica.

Resumen

El brócoli es una inflorescencia cuya vida útil puede verse altamente reducida durante su conservación postcosecha debido a la alta sensibilidad de esta Brassica al etileno. El efecto visual más evidente debido al etileno es el amarilleamiento de esta hortaliza. La producción de etileno del brócoli podría ser reducida con aceites esenciales (AES), incluso a bajas concentraciones. En esta Tesis se estudiará el efecto de aceites esenciales (complejos de inclusión formados con β -ciclodextrina) liberados de un envase activo sobre la producción de etileno del brócoli. Los resultados esperados son: un descenso en la producción de etileno (y conocimiento de la expresión génica de las enzimas claves en la ruta de biosíntesis del etileno) y un aumento de la vida útil del brócoli con el envase activo con aceites esenciales.

Palabras clave: carvacrol; complejo de inclusión; calidad; *Brassica oleracea* var. italica.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se estiman unas pérdidas del 45-55 % de frutas y hortalizas (1). Dichas pérdidas se deben principalmente a las pérdidas por calidad postcosecha, y en gran medida a la aceleración de la senescencia por la acción del etileno (conocida como la hormona de la maduración en las plantas) (2). El etileno es clave en los mecanismos que controlan el crecimiento y desarrollo de las plantas. En general, la acción del etileno no es deseada (excepto algunos usos como en la desverdización de cítricos) ya que reduce la vida útil de los productos hortofrutícolas al acelerar su maduración y senescencia. En particular, la acción del etileno en plantas induce la aparición de brotes y floración, separación de la cáscara y liberación del fruto o destrucción de la clorofila, fundamentalmente. Algunas hortalizas como el brócoli producen poco etileno, pero son

muy sensibles a él. En particular, el efecto del etileno más característico en el deterioro de la calidad del brócoli es el amarilleamiento de las pellas o inflorescencias, lo que provoca un rechazo por parte del consumidor (3). Por otro lado, se produce una pérdida de la calidad bioactiva del brócoli, que es rico en compuestos bioactivos (p.e., glucosinolatos, compuestos fenólicos, vitamina C, carotenoides, etc.) (4). Además, el perfil del consumidor actual se caracteriza por exigir productos naturales saludables sin aditivos, seguros y con una larga vida útil (5), produciéndose éstos mediante procesos sostenibles con envases biodegradables que reduzcan el uso del plástico. Por lo tanto, son necesarias técnicas de postcosecha efectivas y sostenibles para extender la vida útil de productos hortofrutícolas sensibles a la acción del etileno, como es el caso del brócoli.

Los aceites esenciales (AEs) son extractos naturales de plantas, ampliamente aceptados por el consumidor, los cuales poseen elevadas propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Dichas propiedades antimicrobianas están vinculadas a sus compuestos mayoritarios, entre los que se encuentran terpenos, terpenoides y compuestos aromáticos/alifáticos de bajo peso molecular (6). En concreto, el AE de orégano se compone principalmente de carvacrol y timol. La alta actividad antimicrobiana *in vitro* de los AEs y sus principales componentes frente a varios microorganismos alterantes y patógenos ha sido previamente estudiada (6,7).

Además, la actividad antimicrobiana de los componentes de los AEs se incrementa cuando se combina con su AE completo en un 10-30 % (por ejemplo, carvacrol: AE de orégano, 80:20) (6-9). Sin embargo, otros potenciales beneficios de los AEs para mantener la calidad de frutas y hortalizas, extendiendo su vida útil, aún no han sido estudiadas. En concreto, en un experimento puntual que se realizó con manzanas se disminuyó su producción de etileno (hasta un 50-72 %) mediante la exposición a diferentes AEs (linalool, citral, geraniol, citronela, p-cieno, β - pineno, 1-octanal, etc.) (10). Por otra parte, se ha demostrado a nivel genético que los AEs compiten por los sitios activos de enzimas pardeantes en lechuga, quedando así inhibida la actividad de dichas enzimas (11). Sin embargo, no se han estudiado en detalle el mecanismo de inhibición de la producción de etileno mediante los AEs. Por lo tanto, es de gran interés el estudio en profundidad (expresión enzimática/genética) de la respuesta en la producción de etileno a los AEs, para así desarrollar un envase activo de liberación controlada de AEs y poder extender así la vida útil de productos hortofrutícolas sensibles al etileno, como es el caso del brócoli.

Los objetivos de la tesis son: 1. Estudio del efecto de varios aceites esenciales (AEs) (individuales o combinados) liberados de envases activos, a diferentes dosis y temperaturas de conservación, sobre la producción de etileno del brócoli. 2. Obtención de un modelo matemático para optimizar la dosis y combinación óptima de AEs en los envases activos a diferentes temperaturas. 3. Determinación de los cambios en la calidad del brócoli envasado en los envases activos optimizados a diferentes temperaturas de conservación. 4. Determinación de la extensión de la vida útil del brócoli con el envase activo optimizado a diferentes temperaturas de conservación. 5. Difusión de resultados, innovación y transferencia de tecnología al sector industrial.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevarán a cabo las siguientes Tareas, con la metodología que se indica: Determinación de la producción de etileno del brócoli mediante cromatografía de gases (4). Determinación de la actividad de las enzimas implicadas en la biosíntesis de etileno en brócoli (12). Determinación de la expresión génica de los factores de transcripción de las enzimas involucradas en la biosíntesis de etileno y los receptores de membrana de etileno del brócoli (13). Desarrollo de un modelo predictivo que se ajuste a la liberación de AEs del envase activo. Análisis microbiológicos durante la conservación del brócoli con el envase activo (3). Análisis de parámetros físico-químicos (pérdida de peso, incidencia de pudriciones, color, contenido de sólidos solubles, pH y acidez titulable) durante la conservación del brócoli con el envase activo (3). Análisis sensorial del

brócoli durante su conservación con el envase activo. Determinación de la calidad bioactiva del brócoli (glucosinolatos, compuestos fenólicos, carotenoides y capacidad antioxidante) durante su conservación con el envase activo (14). Desarrollo de modelos matemáticos para describir los cambios en los atributos del producto (microbiano, fisicoquímico, sensorial y bioactivo) (15). Aplicación de modelos matemáticos para predecir la vida útil del brócoli (16). Difusión de resultados, innovación y transferencia de tecnología al sector industrial.

3. RESULTADOS ESPERADOS

Entre los resultados esperados en este estudio se enumera: Efecto de los aceites esenciales sobre la producción del brócoli a nivel enzimático y expresión génica, reducción de la producción de etileno en brócoli con un envasado activo con liberación controlada de aceites esenciales y mejora de la calidad del brócoli y aumento de su vida útil.

4. AGRADECIMIENTOS

Quería agradecer a mi director de Tesis Antonio López Gómez por brindarme esta oportunidad y a mi codirector Ginés Benito Martínez Hernández por guiarme en este camino tan apasionante.

5. REFERENCIAS

1. Crisosto CH, Mitchell FG. Postharvest handling systems: Small fruits (I. Table Grapes). In: Kader AA, editor. Postharvest Technology of Horticultural Crops [Internet]. Davis CA (USA): Center, UC Postharvest Technology; 2002 [cited 2020 Apr 17]. p. 535. Available from: http://postharvest.ucdavis.edu/Bookstore/Postharvest_Technology_of_Horticultural_Crops
2. Kader AA. Postharvest Technology of Horticultural Crops - An Overview from Farm to Fork. *J Appl Sci Technol*. 2013;1(1):1-8.
3. Martínez-Hernández GB, Gómez PA, Pradas I, Artés F, Artés-Hernández F. Moderate UV-C pretreatment as a quality enhancement tool in fresh-cut Bimi® broccoli. *Postharvest Biol Technol*. 2011;62(3):327-37.
4. Martínez-Hernández GB, Artés-Hernández F, Gómez PA, Artés F. Induced changes in bioactive compounds of kailan-hybrid broccoli after innovative processing and storage. *J Funct Foods*. 2013;5(1):133-43.
5. AECOSAN. Las tendencias del consumo y del consumidor en el siglo XXI [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/noticias_y_actualizaciones/noticias/2018/jornada_dialogo_nacional.htm], 2018.
6. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol*. 2004;94(3):223-53.
7. López-Gómez A, Ros-Chumillas M, Antolinos V, Buendía-Moreno L, Navarro-Segura L, Sánchez-Martínez MJ, et al. Fresh culinary herbs decontamination with essential oil vapours applied under vacuum conditions. *Postharvest Biol Technol*. 2019;156:110942.
8. Buendía-Moreno L, Ros-Chumillas M, Navarro-Segura L, Sánchez-Martínez MJ, Soto-Jover S, Antolinos V, et al. Effects of an Active Cardboard Box Using Encapsulated Essential Oils on the Tomato Shelf Life. *Food Bioproc Tech*. 2019;12(9):1548-58.
9. Buendía-Moreno L, Sánchez-Martínez MJ, Antolinos V, Ros-Chumillas M, Navarro-Segura L, Soto-Jover S, et al. Active cardboard box with a coating including essential oils entrapped within cyclodextrins and/or halloysite nanotubes. A case study for fresh tomato storage. *Food Control*. 2020;107:106763.
10. Rabbany, A.B.M.G., Mizutani, F., Effect of essential oils on ethylene production and ACC content in apple fruit and peach seed tissues. *Engei Gakkai zasshi*, 1996;65:7-13.
11. Chen X, Ren L, Li M, Qian J, Fan J, Du B. Effects of clove essential oil and eugenol on quality and browning control of fresh-cut lettuce. *Food Chem*. 2017;214:432-9.

12. Kato M, Kamo T, Wang R, Nishikawa F, Hyodo H, Ikoma Y, et al. Wound-induced ethylene synthesis in stem tissue of harvested broccoli and its effect on senescence and ethylene synthesis in broccoli florets. *Postharvest Biol Technol.* 2002;24(1):69-78.
13. Mallona I, Lischewski S, Weiss J, Hause B, Egea-Cortines M. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. *BMC Plant Biol.* 2010;10(1):4.
14. Castillejo N, Martínez-Hernández GB, Gómez PA, Artés F, Aguayo E, Sánchez-Álvarez C, et al. Quality changes of green vegetable smoothies during shelf-life. *Acta Hortic.* 2016;(1141):145-52.
15. González-Tejedor GA, Martínez-Hernández GB, Garre A, Egea JA, Fernández PS, Artés-Hernández F. Quality Changes and Shelf-Life Prediction of a Fresh Fruit and Vegetable Purple Smoothie. *Food Bioproc Tech.* 2017;10(10):1892-904.
16. Coroller L, Jeuge S, Couvert O, Christieans S, Ellouze M. Extending the gamma concept to non-thermal inactivation: A dynamic model to predict the fate of Salmonella during the dried sausages process. *Food Microbiol.* 2015;45:266-75.

Epidemiology and molecular characterization of the main aphid-borne virus infections in cucurbits: Effect of mixed infections on the genetic diversity of viral populations

Epidemiología y caracterización molecular de las principales virosis transmitidas por pulgón en cucurbitáceas: Efecto de las infecciones mixtas en la diversidad genética de las poblaciones virales

M.P. Rabadán^{1*}, P. Gómez¹, M. Juárez²

¹Departamento de Biología del Estrés y Patología Vegetal, CEBAS-CSIC, Campus Universitario de Espinardo, 30100 Murcia. Spain.

²Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Universidad Miguel Hernández de Elche, Orihuela, Alicante. Spain.

*mprabadan@cebas.csic.es

Abstract

The production of cucurbit crops (melon, watermelon, zucchini, squash and cucumber) is continually facing new pests and pathogen diseases of viral etiology. Concurrently, it has been observed a negative impact on the production of these crops, potentially associated with the rise of the organic crop production and aphid-borne viruses that appear to be overlapping at temporal and spatial scales. However, the epidemiological status of aphid-borne viruses affecting cucurbit crops, and the extent in which mixed infections may affect the evolutionary dynamics of viral populations remains unclear. This research work proposes two complementary (descriptive and exploratory) methodological approaches to study and expand our knowledge on the molecular epidemiology and eco-evolutionary dynamics of these viral diseases in cucurbit crops.

Keywords: crops; eco-evolutionary dynamics; plant viral disease; pathology.

Resumen

La producción de cultivos de cucurbitáceas (melón, sandía, calabacín, calabaza y pepino), se enfrenta constantemente a nuevas plagas y enfermedades de etiología viral. En los últimos años, y coincidiendo con el auge de estos cultivos en ecológico, se ha observado un impacto negativo en la producción de estos cultivos, potencialmente asociados a virus transmitidos por pulgón, que aparecen superponerse a escalas espacio-temporales. Sin embargo, la situación epidemiológica de las virosis transmitidas por pulgón afectando los cultivos de cucurbitáceas, y el impacto que pueden tener las infecciones mixtas en las dinámicas evolutivas de las poblaciones virales y la epidemiología de la enfermedad sigue sin estar clara. Este trabajo de investigación plantea dos aproximaciones metodológicas complementarias (una descriptiva y otra exploratoria) para estudiar y ampliar nuestro conocimiento sobre la epidemiología molecular y dinámica eco-evolutiva de estas enfermedades virales en cultivos de cucurbitáceas.

Palabras clave: cultivo; dinámica eco-evolutiva; enfermedades virales de plantas; patología.

1. INTRODUCCION

La horticultura intensiva genera una gran actividad económica en nuestro país. Entre las hortalizas más importantes destacan las que pertenecen a la familia de las Cucurbitáceas (melón, calabacín, sandía, pepino y calabaza) tanto por la superficie dedicada a su cultivo como por el valor económico de su producción. Por ejemplo, España registra unas 23.000 ha dedicadas al cultivo de melón con una producción de 750.600 t. Sin embargo, y pese a su importancia agronómica y económica, hay un escaso conocimiento sobre la epidemiología de las enfermedades que afectan a estos cultivos. Entre los patógenos que afectan a las cucurbitáceas, se han identificado numerosos virus (al menos 60), y entorno a una docena son transmitidos por pulgón y mosca blanca (1–3). Entre estos virus destacan el virus del amarilleo de las cucurbitáceas transmitido por pulgones (Cucurbit aphid-borne yellows virus, CABYV) y el virus del mosaico de la sandía (Watermelon mosaic virus, WMV). Estos virus han sido identificados tanto en infección simple como en infección mixta de forma mayoritaria en los campos de cultivo del sudeste español (4–6). Tanto CABYV como WMV presentan un cierto grado de polifagia entre otras especies cultivadas y flora arvense. Además, están ligados a un mismo tipo de transmisión vectorial por pulgones, los cuales en algunos casos se comportan como plagas habituales en los cultivos. Durante los últimos años, los estudios epidemiológicos realizados por el grupo de Patología Vegetal (CEBAS) indican que cultivos de cucurbitáceas muestran una elevada frecuencia de plantas sintomáticas asociadas a virus. Esto puede ser debido al incremento de cultivos en sistemas de producción ecológico, y subraya la necesidad de identificar qué virus afectan a estos cultivos, y el alcance que pueden tener las infecciones mixtas en las dinámicas eco-evolutivas de las poblaciones virales en estos cultivos.

2. OBJETIVOS

Este proyecto de tesis doctoral pretende (i) continuar con los estudios epidemiológicos de virosis en cultivos de cucurbitáceas, (ii) ampliar nuestro conocimiento sobre la estructura genética de las poblaciones virales que afectan a estos cultivos, (iii) evaluar el impacto de las infecciones mixtas en las dinámicas eco-evolutivas de las poblaciones virales, y (iv) conocer los mecanismos moleculares asociados con la transmisión de virus por pulgones, con la finalidad de ayudar al desarrollo de estrategias que sean eficientes en la prevención y el control de enfermedades virales.

Los objetivos específicos son:

Objetivo 1. Estudiar la distribución y estructura genética de las poblaciones de virus transmitidas por pulgones en las muestras de melón, calabacín, sandía, calabaza y pepino procedentes de tres comarcas productoras del sureste de España (Campo de Cartagena, Vega Alta y Media del Segura, y, Alicante y Vega Baja del Segura).

Objetivo 2. Evaluar el impacto de las infecciones mixtas virales y condiciones abióticas como la temperatura en las dinámicas poblacionales y evolutivas del virus, examinando acumulación viral y variabilidad genética de las poblaciones virales.

Objetivo 3. Examinar el efecto de las infecciones mixtas virales y condiciones abióticas como la temperatura en la relación virus-vector en melón y calabacín, analizando la tasa de transmisión y el comportamiento del vector, además de la expresión diferencial de genes del vector implicados en la transmisión.

Objetivo 4. Localizar CABYV y WMV a nivel celular en el vector y determinar cómo proteínas virales y del vector influyen recíprocamente en la transmisión de cada virus. Conocer cómo las infecciones mixtas pueden influir en la transmisión de virus no-relacionados. Estudio de

localización de CABYV y WMV dentro del vector y corroborar las interacciones de ambos virus con proteínas del vector.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hasta la fecha se ha conseguido analizar una colección de muestras sintomáticas de diferentes especies de plantas cultivadas que comprendía desde 2011 hasta 2019. Los resultados muestran que las dos especies de virus mayoritarias en los cultivos de melón y calabacín de la Región de Murcia son CABYV y WMV (Fig. 1). Asimismo, CABYV y WMV fueron detectados simultáneamente en una gran proporción de muestras, revelando la elevada cantidad de infecciones mixtas que hay entre ellos y con otros virus presentes en el campo de manera minoritaria. Teniendo en cuenta estos resultados preliminares, y sabiendo que, CABYV y WMV, son los virus mayoritarios en nuestras zonas de cultivo, los siguientes objetivos se centrarán en el estudio de ambos virus tanto en infección simple como en infección mixta, en cultivos de melón y calabacín, dos de los cultivos más extensos en las zonas productoras.

A continuación, se está llevando a cabo una selección de aislados de CABYV y WMV procedentes de cada año muestreado y ambos cultivos para realizar una caracterización genética de sus genomas completos. Hasta el momento se han secuenciado dos aislados de CABYV, donde hemos podido comprobar filogenéticamente que están dentro de los aislados españoles, y son similares genéticamente entre ellos y con el resto de aislados españoles.

Posteriormente, se examinará cómo las infecciones mixtas afectan a la dinámica evolutiva de los virus. Para ello, se realizarán dos clones infectivos de CABYV y WMV para realizar inoculaciones de grupos de plantas con las diferentes combinaciones en infecciones simples y mixtas. Se examinará la acumulación viral en cada especie de planta cultivada y se realizará secuenciación de los genomas completos por secuenciación masiva. Además, se estudiarán cómo las condiciones abióticas (Temperatura de crecimiento de las plantas) puede afectar a la acumulación viral y a las interacciones virus-virus dentro de la misma planta.

Por otro lado, teniendo en cuenta que los virus se transmiten mediante diferentes métodos de transmisión, y recientemente se ha planteado la posibilidad de que los virus pueden modificar rutas bioquímicas de los vectores, plantaremos el estudio del efecto de las interacciones simples o mixtas, CABYV y WMV, así como la temperatura, para saber el efecto que tienen en los genes del vector mediante transcriptómica.

Finalmente, se estudiará qué proteínas del vector están involucradas en la transmisión de CABYV y WMV. Y también, conocer el efecto de la infección mixta de virus no relacionados en la transmisión.

4. CONCLUSIONES

CABYV y WMV son los virus predominantes en los cultivos de cucurbitáceas del sudeste peninsular.

5. AGRADECIMIENTOS

Proyecto estatal I+D+i: Epidemiología y caracterización de las virosis transmitidas por pulgón en cucurbitáceas (MINECO, AGL2017-89550-R).

6. REFERENCIAS

1. Alonso-Prados JL, Aranda MA, Malpica JM, García-Arenal F, Fraile A. Satellite RNA of cucumber mosaic cucumovirus spreads epidemically in natural populations of its helper virus. *Phytopathology*. 1998;88(6):520-524. doi:10.1094/PHYTO.1998.88.6.520.
2. Fauquet CM, Fargette D. International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. *Virology*. 2005;2:1-10. doi:10.1186/1743-422X-2-64.
3. Lecoq H, Desbiez C. Viruses of Cucurbit Crops in the Mediterranean Region: An Ever-Changing Picture. *Adv Virus Res*. 2012;84:67-126. doi:10.1016/B978-0-12-394314-9.00003-8.
4. Juárez M, Legua P, Mengual CM, et al. Relative incidence, spatial distribution and genetic diversity of cucurbit viruses in eastern Spain. *Ann Appl Biol*. 2013;162(3):362-70. doi:10.1111/aab.12029
5. Kassem M a, Juárez M, Gómez P, et al. Genetic Diversity and Potential Vectors and Reservoirs of Cucurbit aphid-borne yellows virus in Southeastern Spain. *Phytopathology*. 2013;103:1188-97. doi:10.1094/PHYTO-11-12-0280-R.
6. Kassem MA, Sempere RN, Juárez M, Aranda MA, Truniger V. Cucurbit aphid-borne yellows virus is prevalent in field-grown cucurbit crops of southeastern Spain. *Plant Dis*. 2007;91(3):232-8. doi:10.1094/PDIS-91-3-0232.

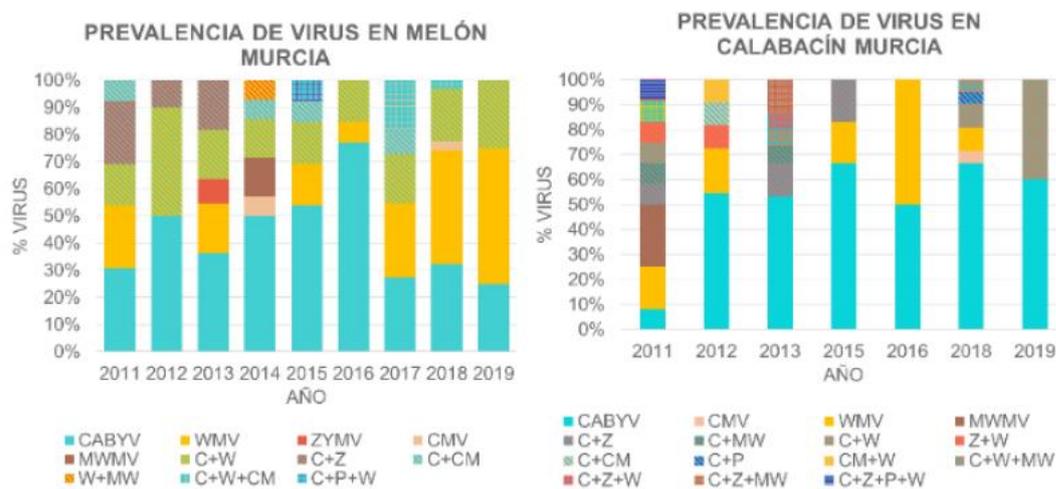


Figura 1. Detección (%) de los diferentes tipos de virosis en cultivos de melón y calabacín de la Región de Murcia desde la campaña de 2011 hasta 2019. La proporción de cada virus/año está representada por el área de cada barra con un color de fondo solido (infecciones simples) y fondo trazado (infecciones mixtas), destacando CABYV (azul) y WMV (amarillo).

New functional low-sugar and rich in bioactive compounds beverage. Optimisation of the process

Nueva bebida funcional baja en azúcar y rica en compuestos bioactivos. Optimización del proceso

F.J. Salar^{1*}, P.S. Fernández², C. García-Viguera¹

¹Laboratorio de Fitoquímica y Alimentos Saludables, Grupo de calidad, seguridad y bioactividad de alimentos vegetales, Departamento Ciencia y Tecnología de Alimentos, CEBAS-CSIC, Campus Universitario de Espinardo, 25, 30100 Murcia. Spain.

²Departamento de Ingeniería Agronómica. ETSIA. Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena. Spain.

*fjsalar@cebas.csic.es

Abstract

Nowadays, low-sugar plant-based beverages, such as those citrus and red fruit-based, are a promising way to consume health-promoting nutrients. The development of safe and organoleptic attractive beverages, enriched in bioactive and bioavailable compounds, is of high interest. This, together, with providing alternatives to fast-absorbing carbohydrates, with the purpose of reducing the consumption of sugars, implies the need for an evaluation of the safety of the new products and an optimization of their processing. In order to cover this, the study of different alternatives based on thermal and non-thermal treatments is of interest. Furthermore, a multi-criteria decision analysis is necessary to optimize the results obtained, together with the estimated costs of the different alternatives, which will be useful to improve its implementation on an industrial scale.

Keywords: Citrus; Maqui berry; sweeteners; phenolic compounds; emerging technologie.

Resumen

Actualmente, las bebidas a base de frutas y hortalizas, como por ejemplo con cítricos y frutos rojos, con bajo contenido en azúcar, son una prometedora forma de consumo de nutrientes promotores de la salud. El desarrollo de bebidas organolépticamente atractivas y seguras, enriquecidas en compuestos bioactivos y biodisponibles, que aporten alternativas a los carbohidratos de rápida absorción, con la finalidad de reducir el consumo de azúcares en la población, conlleva la necesidad de una evaluación de la seguridad de los nuevos productos y una optimización de su procesado. Para ello se han de estudiar diferentes alternativas basadas en tratamientos térmicos y no térmicos. Además es necesario un análisis de decisión multi-criterio que optimice los resultados obtenidos, junto con las estimaciones de costes de las mismas, que será útil para optimizar su elaboración a escala industrial.

Palabras clave: Cítricos; Maqui berry; edulcorantes; compuestos fenólicos; tecnologías emergentes.

1. INTRODUCCIÓN

El consumidor de hoy día presenta una gran preocupación por su salud, estableciendo una relación, cada vez más directa entre alimento y salud. De entre los principales problemas destaca la alta ingesta en bebidas con alto contenido en azúcar, lo cual está relacionado un mayor riesgo

de padecer enfermedades cardiovasculares, una mayor ganancia de peso corporal y patologías como la hiperuricemia o la hipertensión (1,2). Este tipo de bebidas, elaboradas generalmente con sacarosa y/o jarabe de fructosa, son fuentes de azúcares rápidamente absorbibles que producen un aumento rápido de glucosa e insulina en plasma, lo que conlleva a una resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa. Para paliar este problema, parte de la investigación se focaliza en nuevas formulaciones, que aumenten la vida útil de las frutas frescas, preserven los nutrientes y reduzcan el contenido glucémico de las bebidas comerciales azucaradas.

Una estrategia para reducir el contenido en azúcares es mediante edulcorantes artificiales. No obstante, existe cierta polémica en relación a su uso, ya que pueden contribuir a una mayor ingesta calórica y obesidad, por mecanismos que pueden estar mediados por la microbiota colónica (3). Además, aunque hay una amplia variedad de edulcorantes autorizados, los consumidores muestran un interés creciente por los naturales como la stevia. Por todo ello, existe una gran demanda de bebidas saludables, sin edulcorantes artificiales añadidos, que proporcionen una ingesta elevada de compuestos bioactivos naturales.

En relación con todo ello la elaboración de bebidas naturales tienen una gran demanda. Así, los cítricos son una apuesta importante, ya que incluyen altas concentraciones de vitamina C, ácido cítrico, minerales y flavonoides, especialmente flavanonas, como la hesperidina (4), cuya ingesta va asociada a la prevención de enfermedades neurodegenerativas y relacionadas con la inflamación (5,6).

Por otro lado, el maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz) es fuente de antocianos (derivados de cianidina y delphinidina) y ácidos hidroxicinámicos (7), los cuales se ha descrito que mejoran la hiperglicemia y la sensibilidad a la insulina (8). Además, sus extractos han demostrado tener actividad antioxidante y capacidad de inhibición de la adipogénesis y la inflamación (9), así como inhibición de enzimas implicados en la absorción de azúcares (10).

Para garantizar la conservación y seguridad de un nuevo producto es necesario evaluar y validar tecnologías que permitan su conservación y optimicen la retención de compuestos de interés nutricional, garantizando su inocuidad para el consumidor. En este sentido, la sustitución del azúcar por edulcorantes supone una modificación importante de parámetros relacionados con la estabilidad y seguridad microbiológica, al variar, por ejemplo, la aw. Si bien la tecnología más utilizada de conservación de alimentos sigue siendo el tratamiento térmico, existen equipos que permiten optimizar su intensidad, basándose en la modelización matemática de su efecto sobre los microorganismos (11). Además, hay otras tecnologías emergentes y novedosas que permiten una aplicación eficiente de calor (calentamiento por microondas) (12) o no térmicas (altas presiones hidrostáticas) (13). Para su correcto uso hay que evaluar su impacto sobre la inactivación microbiana/enzimática, con el fin de garantizar su inocuidad (ausencia de enfermedad por su consumo) y su estabilidad durante la vida útil, así como su efecto sobre los fitoquímicos bioactivos.

El objetivo fue optimizar las condiciones que permitan maximizar el contenido de estos compuestos funcionales promotores de la salud, garantizando la seguridad y estabilidad microbiológica de las bebidas, además teniendo en cuenta la evaluación de costes del producto. Para ello es de gran utilidad la optimización multiobjetivo: La dinámica y no linealidad de los modelos en este campo hacen necesaria la utilización de métodos de optimización global para el cálculo del conjunto de soluciones óptimas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Desarrollo de diferentes formulaciones de la bebida y su optimización organoléptica

Se realizará el diseño de las bebidas que proporcionen un valor añadido en base a su contenido en compuestos (poli)fenólicos, aportados por los cítricos y maqui, estudiando diferentes edulcorantes naturales (sacarosa-control, sucralosa y stevia) basándose en experiencias previas de estudios de dosificación de ingredientes (14), y optimizando su perfil organoléptico a través de la realización de paneles de cata y pruebas sensoriales con escalas de referencia y de puntuación estándar, de acuerdo a la legislación europea y española y reglamentos técnico-sanitarios que recogen los máximos niveles permitidos para su uso como ingredientes (14).

2.2 Procesamiento de las bebidas mediante tratamientos térmicos y no térmicos

Se elaborarán las bebidas mediante diferentes tratamientos tanto térmicos (calor convencional en termorresistómetro Mastia, o calentamiento por microondas) como no térmicos (alta presión hidrostática), con envasado en atmosfera de nitrógeno tras eliminar el aire y almacenamiento durante 60 d, a diferentes temperaturas.

2.3 Análisis fisicoquímico de las bebidas y evaluación de su seguridad y estabilidad microbiológica

Se realizará la caracterización fitoquímica/nutricional de la bebida de frutas con los distintos edulcorantes, mediante el análisis de compuestos fenólicos por HPLC-DAD y HPLC-MS-MS (7), vitamina C por HPLC- QQQ (15). Además de analizar otros parámetros físico-químicos (16), color (CIEL*a*b*) (4), análisis mineral por EAA-ICP, o capacidad antioxidante. Adicionalmente se llevarán a cabo tanto un análisis microbiológico de las bebidas, con el fin de determinar los microorganismos patógenos y alteradores alimentarios presentes en las bebidas, controlando en todas ellas las condiciones de tiempo y temperatura.

2.4 Evaluación de la vida útil de las bebidas y optimización de parámetros y costes

Todos los parámetros comentados en el apartado anterior se analizarán justo después del procesado de las muestras y durante 60 d de almacenamiento, mediante una simulación de distintos escenarios de condiciones de conservación doméstica y comercial, para estudiar la influencia de la conservación en los perfiles organoléptico y fitoquímico y su estabilidad microbiológica, en función de los diferentes endulzantes y su concentración, y de esta manera establecer y optimizar el periodo de vida útil del producto y los costes a escala semi-industrial, a través de la optimización multiobjetivo mediante métodos de optimización global para el cálculo del conjunto de soluciones óptimas, tipo frente de Pareto.

3. RESULTADOS ESPERADOS

De los resultados se espera obtener una bebida saludable, organolépticamente atractiva y segura, enriquecida en compuestos bioactivos y biodisponibles, que aporte alternativas a los carbohidratos de rápida absorción, con la finalidad prioritaria de reducir el consumo de azúcares en la población. Además, todos los resultados obtenidos de los diferentes tratamientos tecnológicos, junto con estimaciones de los costes de las distintas alternativas, se optimizarán mediante un análisis de decisión multi-criterio para su aprovechamiento a escala industrial.

4. CONCLUSIONES

Se hace indispensable el estudio de formulaciones ricas en compuestos bioactivos fenólicos y diferentes endulzantes, ya que éstos pueden tener una gran influencia sobre el perfil fitoquímico de la bebida final, así como en la seguridad alimentaria, vida útil y aspectos organolépticos. Además, este estudio servirá para aumentar la ingesta de compuestos presentes en frutas y hortalizas, con la consabida prevención de ciertas enfermedades asociadas a estrés oxidativo.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo será financiado por el MINECO español a través del Proyecto de Investigación AGL2016-75332-C2-1-R (AEI / FEDER, UE). F.J. Salar tiene el apoyo de la subvención FPU (FPU18/00332) del Programa de Becas del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.

6. REFERENCIAS

1. Bray GA. Energy and Fructose From Beverages Sweetened With Sugar or High-Fructose Corn Syrup Pose a Health Risk for Some People. *Adv Nutr.* 2013;4(2):220–5.
2. Lakhan SE, Kirchgessner A. The emerging role of dietary fructose in obesity and cognitive decline. *Nutr J.* 2013;12(1):1–12.
3. Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thaiss CA, Maza O, et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature.* 2014;514(7521):181–6. <http://dx.doi.org/10.1038/nature13793>
4. González-Molina E, Domínguez-Perles R, Moreno DA, García-Viguera C. Natural bioactive compounds of Citrus limon for food and health. *J Pharm Biomed Anal.* 2010;51(2):327–45.
5. Hajjalyani M, Farzaei MH, Echeverría J, Nabavi SM, Uriarte E, Eduardo SS. Hesperidin as a neuroprotective agent: A review of animal and clinical evidence. *Molecules.* 2019;24(3).
6. Hägele FA, Büsing F, Nas A, Aschoff J, Gnädinger L, Schweiggert R, et al. High orange juice consumption with or in-between three meals a day differently affects energy balance in healthy subjects. *Nutr Diabetes.* 2018;8(1). <http://dx.doi.org/10.1038/s41387-018-0031-3>
7. Gironés-Vilaplana A, Baenas N, Villaño D, Speisky H, García-Viguera C, Moreno DA. Evaluation of Latin-American fruits rich in phytochemicals with biological effects. *J Funct Foods.* 2014;7(1):599–608.
8. Hanhineva K, Törrönen R, Bondia-Pons I, Pekkinen J, Kolehmainen M, Mykkänen H, et al. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int J Mol Sci.* 2010;11(4):1365–402.
9. Schreckinger ME, Wang J, Yousef G, Lila MA, De Mejia EG. Antioxidant capacity and in Vitro inhibition of adipogenesis and inflammation by phenolic extracts of *Vaccinium floribundum* and *Aristotelia chilensis*. *J Agric Food Chem.* 2010;58(16):8966–76.
10. Rubilar M, Jara C, Poo Y, Acevedo F, Gutierrez C, Sineiro J, et al. Extracts of maqui (*Aristotelia chilensis*) and murta (*Ugni molinae* Turcz.): Sources of antioxidant compounds and α -glucosidase/ α -amylase inhibitors. *J Agric Food Chem.* 2011;59(5):1630–7.
11. Garre A, Fernández PS, Lindqvist R, Egea JA. Bioinactivation: Software for modelling dynamic microbial inactivation. *Food Res Int.* 2017;93:66–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.01.012>
12. Reverte-Ors JD, Pedreño-Molina JL, Fernández PS, Lozano-Guerrero AJ, Periago PM, Díaz-Morcillo A. A novel technique for sterilization using a power self-regulated single-mode microwave cavity. *Sensors.* 2017;17(6):1309.
13. Toepfl S, Mathys A, Heinz V, Knorr D. Review: Potential of high hydrostatic pressure and pulsed electric fields for energy efficient and environmentally friendly food processing. *Food Rev Int.* 2006;22(4):405–23.
14. Gironés-Vilaplana A, Calín-Sánchez Á, Moreno DA, Carbonell-Barrachina ÁA, García-Viguera C. Novel maqui liquor using traditional pacharán processing. *Food Chem.* 2015;173:1228–35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.062>
15. Baenas N, Salar FJ, Domínguez-Perles R, García-Viguera C. New UHPLC-QQQ-MS/MS method for the rapid and sensitive analysis of ascorbic and dehydroascorbic acids in plant foods. *Molecules.* 2019;24(8):1632
16. González-Trujano ME, Pellicer F, Mena P, Moreno DA, García-Viguera C. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a pomegranate (*Punica granatum* L.) extract rich in ellagitannins. *Int J Food Sci Nutr.* 2015;66(4):395–9.

Enhancement of bioactive compounds of sprouts during self-life by combined abiotic stresses

Incremento de compuestos bioactivos durante la vida comercial de germinados mediante estreses abióticos

A. Daoud*, L. Martínez-Zamora, F. Artés-Hernández

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

*amelusma@hotmail.fr

Abstract

Sprouts (germinated seeds) usually have a high content of nutrients and are a good source of antioxidants, amino acids, and dietary fiber. Germination can eliminate the toxic anti-nutrients present in the seeds and increase the enzymatic activity. The main objective of this work is to study different pre and postharvest treatments to improve biosynthesis of bioactive compounds in germinated seeds. For this purpose, the application of combined abiotic stresses will be addressed, such as LED or UV lights and the application of essential oils. We expect to enhance the nutritional quality of these products to increase their global consumption increasing healthiness of consumers.

Keywords: minimal processing; LED; UV-B; UV-C; essential oils.

Resumen

Los brotes de semillas germinadas suelen tener un alto contenido de nutrientes y son una buena fuente de antioxidantes, aminoácidos y fibra dietética. La germinación puede eliminar los anti-nutrientes tóxicos presentes en las semillas y aumentar la actividad enzimática. El objetivo principal de este trabajo es estudiar diferentes tratamientos pre y postcosecha para mejorar la biosíntesis de compuestos bioactivos en semillas germinadas. Para ello, se abordará la aplicación de tensiones abióticas combinadas, como luces LED o UV y la aplicación de aceites esenciales. Esperamos mejorar la calidad nutricional de estos productos para aumentar su consumo global aumentando la salud de los consumidores.

Palabras clave: procesado mínimo; LED; UV-B; UV-C; aceites esenciales.

1. INTRODUCTION

Germinated seeds were part of the menu of civilizations such as the Sumerians, Celts, Chinese or Essences. In the last decades of the past century, the attention of experts dealing with the healthy nutrition turned more and more towards the determination of the biological value of the nutritional sprouts (1). In fact, they have become a trendy food. For instance, sprouts are ‘the product obtained from the germination of seeds and their development in water, harvested before the development of true leaves and which is intended, including the seed’ (1). The nutrients of sprouts and microgreens include proteins, vitamins, phenolics, carotenoids, glucosinolates, and minerals. It is worth noting that the content of bioactive compounds in sprouts and microgreens are higher than those of their mature counterparts (2).

All these components have health benefits on our organism against several diseases like increased vitality, prevention of cardiovascular risks, valuable help to eliminate excess fat,

strengthening the immune system, decrease in blood cholesterol levels, significant improvement in digestion, and rejuvenation of the skin cells by reduction of ROS (Reactive Oxygen Substances) (3). In contrast, sprouts are confronted with several agents that contribute to destroy and diminish their quality, such as wounding, radiation exposure, hyperoxia storage and biotic and abiotic stress caused by the enzyme phenylalanine ammonia-lyase (PAL) (4).

Recently, different postharvest treatments techniques have been applied to sprouts in order to enhance the formation of bioactive compounds in germinated seeds. For instance, application of LED lighting (blue, red, and far red) can be enhance the biosynthesis of bioactive compounds, as well as the application of UV (B, C, and B+C) radiation, in combination to essential oils or individually. These techniques are composed of a spectrum from different wavelengths and different color LED lightings: blue, green, far red, red, and cold white. Thus, they allow providing lighting adapted to the plant, according to the level of its growth. In addition, the quality of the ascorbic acid production has demonstrated to be higher, as well as the chlorophyll content under a LED lighting (2).

Similarly, UV-C application has shown to decreased the photosynthetic characteristics, plant length, and the concentrations of chlorophyll and while UV-B radiation positively affects to the stem diameter, fresh weight and dry weight of the plant, which is highly related to the morphology of the plant and the phytochemical content (5).

Besides, every essential oil is composed of different aromatic substances with antibacterial, antiviral and antiparasitic properties. In this way, each molecule will be active to kill an insect, to repel another or to cleanse a plant (6). Regarding essential oil application, thyme is commonly used as species for cooking due to their aroma and other properties such as antimicrobial, antiseptic and antioxidant activities (7). Besides, it is also rich in polyphenols and other compounds with biological activity (8-10). Therefore, it can be used as alternative food additives to delay bacterial food spoilage and inhibit the growth of pathogenic bacteria such as *E. coli* in vegetables (9, 11).

The main aim of this work is to study the different postharvest treatments to enhance the formation of bioactive compounds in germinated seeds. For that, the application of combined abiotic stresses is going to be addressed. Therefore, the following specific goals will be:

- Study of the application of LED lights (blue, red, and far-red) on sprouts during post-harvest to improve their nutritional quality and composition of phytochemical compounds.
- Study of the application of UVB and UVC on sprouts during post-harvest to improve the nutritional quality and composition of phytochemical compounds.
- Study of the application of essential oils (from thyme, Rosemary, olive tree, etc.) on sprouts during post-harvest to improve their nutritional quality and composition of phytochemical compounds.

2. MATERIALS AND METHODS

For the development of this Thesis, it will be divided into three Phases:

Trial I: Study of essential oils and their characterization.

Trial II: Study of the enrichment of seed sprouts, through the addition of essential oils and abiotic stresses (UV-B and UV-C).

- Application of essential oils to seed sprouts and abiotic stresses (UVB and UVC) to increase their shelf life.

Trial III: Study of the enrichment of seed sprouts, through the addition of essential oils and abiotic stresses (LED lights).

- Application of essential oils in seed sprouts and abiotic stresses (Blue, Red and Far Red, LEDs) to increase their shelf life.

3. EXPECTED RESULTS

After applying these techniques, we hope to improve the productivity and quality of these products in order to increase their overall consumption and the health of the consumer. Table 1 represents the different treatments of sprouts during postharvest and their effects on plants, which have reported positive results and improved the physico-chemical properties in a natural way free of harmful and toxic chemicals for the plant and the consumer.

4. CONCLUSIONS

These applied techniques should make it possible to obtain products of high nutritional value, that can improve the human health maintaining the food quality of this kind of product. This fact can contribute to the fight against malnutrition and the development of functional foods, whose consumption can avoid or retard the apparition of chronic diseases.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The project was financed by the Autonomous Community of the Region of Murcia (no. 20 849/PI/18) through the grant call for projects for the development of scientific and technical research by competitive groups, included in the Regional Programme for the Promotion of Scientific and Technical Research (Action Plan 2018) of the Seneca Foundation – Science and Technology Agency of the Region of Murcia (Spain).

6. REFERENCES

1. Di Gioia F, Renna M, Santamaria P. Sprouts, microgreens and “baby Leaf” vegetables In Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables. Springer: Boston, MA, USA. 2017;403–32.
2. Fiutaka G, Michalczyka M, Filipczak-Fiutakb M, Fiedorc L, Surówka K. The impact of LED lighting on the yield, morphological structure and some bioactive components in alfalfa (*Medicago sativa* L.) sprouts. Food Chem. 2016;285:53-8.
3. Slavin JL, Lloyd B. Health benefits of fruits and vegetables. Adv Nutr. 2012;3:506-16.
4. Bahri-Bochra A, Mechichi G, Rouissi W, Jilani IB, Ghrabi-Gammar Z. Effects of cold-storage facility characteristics on the virulence and sporulation of *Penicillium expansum* and the efficacy of essential oils against blue mold rot of apples. Folia Hort. 2019;31(2):301-17.
5. Fang-Min L, Zhi-Guo L, Ming Y. Analysis of Photosynthetic Characteristics and UV B Absorbing Compounds in Mung Bean Using UV-B and Red LED Radiation. J Anal Methods Chem. 2014. DOI: 10.1155/2014/378242.
6. Taban A, Rahimi M, Saharkhiz MJ, Hadian J, Zomorodian K. The Efficacy of *Satureja khuzistanica* Essential Oil Treatment in Reducing *Escherichia coli*O157:H7 Load on Alfalfa. J Food Saf. 2013;33(2):121-7.
7. Köksal E, Bursal İ, Gülçin M, Korkmaz C, Çağlayan AC, Gören SH. Antioxidant activity and polyphenol content of Turkish thyme (*Thymus vulgaris*) monitored by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. Int J Food Prop. 2017;20(3):514-25.
8. Barba FJ, Esteve MJ, Frígola A. Bioactive Components from Leaf Vegetable Products. In Atta-ur-Rahman (Ed.), Studies in Natural Products Chemistry. 2014;41:321-46.
9. Bubonja-Sonje J, Giacometti M. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols, Food Chem. 2011;1821-7.

10. Lorenzo JM, Mousavi M, Khaneghah M, Gavahian K, Marszałek I, et al. Understanding the potential benefits of thyme and its derived products for food industry and consumer health: From extraction of value-added compounds to the evaluation of bioaccessibility, bioavailability, anti-inflammatory, and antimicrobial activities. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2019;59(18):2879-95.
11. Nikmaram S, Budaraju FJ, Barba JM, Lorenzo RB, Cox K, Mallikarjunan S, Roohinejad A. Application of plant extracts to improve the shelf-life, nutritional and health-related properties of ready-to-eat meat products. *Meat Sci.* 2018;145:245-55
12. Sayed AS, Goli AH, Shahedi M, Soleimanian-Zad S. Changes in nutritional value and application of thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil on microbial and organoleptic markers of Persian clover (*Trifolium resupinatum*) sprouts. *LWT.* 2016;67:14-21.
13. Zhanga X, Bianb Z, Yuana X, Chena X, Chungui L. A review on the effects of light-emitting diode (LED) light on the nutrients of sprouts and microgreens. *Trends Food Sci Technol.* 2019;99:203-16.
14. Zhicheng Y, Junyan S, Gao LP, Wang Q, Zuo JH. The combined treatment of broccoli florets with kojic acid and calcium chloride maintains post-harvest quality and inhibits off-odor production. *Sci Hort.* 2020;262:109019 .
15. Nájeraa C, Guil-Guerrero JL, Jarquín E, Álvaro JE, Urrestarazub M. LED-enhanced dietary and organoleptic qualities in postharvest tomato fruit. *Postharvest Biol Tec.* 2018;145:151-6.

Table 1. Expected results of the present study.

Treatment techniques	Examples of spices	Results
Oil essential (citronella, thyme, coriander, etc.)	Persian clover, sun flower sprouts, and daikon sprouts (12).	The treatment of essential oils has shown several results in common: -Enhancing phytochemicals -Enhanced plants growth -Improve microbial counts (13)
UV-B / UV-C	Mung bean, soybean, white radish sprouts.	The treatment of UVB and C has shown: -Improved of the total phenolic and flavonoid contents, which is related to their antioxidant activities. -UV-B promotes horizontal growth of stems and the synthesis of UV-B absorbing compounds. - Reduces photosynthetic characteristics, plant length, and the concentrations of chlorophyll a and b. - Strengthen the content of micronutrients and also the resistance of plants to pathogens (UV-C) (5)
LED	Alfalfa sprouts (2) and microgreens (14,15)	LED treatment is a less expensive and effective treatment for the nutritional improvement of plants. - LED light stimulates the accumulation of phytochemicals, such as: phenolic compounds, vitamins, glucosinolates, chlorophyll, and carotenoids. - Stabilize accumulation of secondary metabolites (MS) (2)

Evaluation and prioritization of biological risk in Ready-To-Eat (RTE) meat products through mathematical modelling

Evaluación y priorización del riesgo biológico en productos cárnicos listos para comer (LPC) a través de modelos matemáticos

L. Georgalis^{1*}, P.S. Fernández¹, A.P. Garre¹, A. Psaroulaki²

¹Department of Agronomical Engineering, ETSIA. Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena. Spain.

²Department of Clinical Microbiology and Microbial Pathogenesis, School of Medicine, University of Crete, Voutes-Staurakia, 71110 Heraklion, Crete. Greece.

*leonidas.georgalis@upct.es

Abstract

Modern food production has reduced the cost and increased the variety of food available, but this centralisation of the food supply presents an opportunity for foodborne pathogens and toxins to infect and poison large numbers of consumers. Modelling is a key tool to ensure the safety of food produced from raw material to the final consumer. The starting hypothesis is that it is possible to improve the safety of Ready To Eat (RTE) meat products by evaluation / prioritization of biological risks. Risk ranking of feed/food safety and nutritional related health risks is generally recognised as the starting point for risk-based priority setting and resource allocation, as it permits policymakers to allocate their resources on the most significant public health problem. The outcome of the thesis will be a robust tool for food safety management that can be implemented by all stakeholders, such as agencies related to consumer protection (EFSA, ECDC) and industry.

Keywords: food safety; risk assessment; foodborne disease.

Resumen

La producción moderna de alimentos ha reducido el coste y ha aumentado la variedad de alimentos disponibles, pero esta centralización del suministro de alimentos presenta una oportunidad para que los patógenos y toxinas transmitidos por los alimentos infecten y envenenen a un gran número de consumidores. El modelado es una herramienta clave para garantizar la seguridad de los alimentos producidos a partir de materias primas para el consumidor final. La hipótesis inicial es que es posible mejorar la seguridad de los productos cárnicos listos para comer (LPC) mediante la evaluación/priorización de riesgos biológicos. La clasificación de riesgos de los riesgos para la salud de los alimentos y la seguridad alimentaria y nutricional se reconoce generalmente como el punto de partida para el establecimiento de prioridades basadas en el riesgo y la asignación de recursos, ya que permite a los encargados de formular políticas asignar sus recursos al problema de salud pública más importante. El resultado de esta tesis será una herramienta sólida de gestión de la inocuidad de los alimentos que puede ser implementada por todos los interesados, como las agencias de protección al consumidor (EFSA, ECDC) y la industria.

Palabras clave: seguridad alimentaria; evaluación de riesgos; enfermedad transmitida por alimentos.

1. INTRODUCTION

Mainly, two pathogens have been studied extensively the past decade, regarding their potential to produce foodborne illnesses. *Listeria monocytogenes*, the foodborne pathogen responsible for listeriosis, and *Escherichia coli*. Surprisingly, the number of reported confirmed listeriosis cases further increased in 2018, despite listeria rarely exceeding the EU food safety limit tested in ready-to-eat food. Therefore, further research is needed to fill-in the gaps of previous risk assessments for *L. monocytogenes* (1).

On the other hand, pathogens such as *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* and *Campylobacter* need further investigation and justification about their role in RTE meat food products. The annual report on trends and sources of zoonoses, published by the European Food Safety Authority (EFSA) and the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) for the year 2018, showed that *Salmonella* is the most common cause of foodborne outbreaks in the European Union. In 2018, 91,857 confirmed cases of salmonellosis in humans were reported with an EU notification rate at 20.1 cases per 100,000 population (1). *S. aureus* is recognized as one of the major foodborne pathogens in fresh and ready-to-eat products and responsible for various infections around the world. Staphylococcal enterotoxins have been detected in many foodstuff causing staphylococcal food poisoning, toxic shock, and allergic and autoimmune reactions (2). Furthermore, Campylobacteriosis is the most commonly reported gastrointestinal disease in humans in the EU and has been so since 2005. In 2018, the number of confirmed cases of human campylobacteriosis was 246,571 corresponding to an EU notification rate of 64.1 per 100,000 population (1).

Because growth and survival under stressful conditions is the norm, the responses and survival of bacteria and other microbes during exposure to environmental stresses has become an important area of study in microbiology (3). Acclimation involves physiological, anatomical, or morphological adjustments within a single organism that improve performance or survival in response to environmental change. The extent of this acclimation is constrained by the genome of the individual (4). The ability to adapt rapidly to environmental change is essential for bacteria survival and virulence, and both stress responses and virulence genes are expressed in response to environmental signals (5).

Mathematical models used in predictive microbiology have a strong empirical nature, including some model parameters that must be estimated based on experimental data. The variability in the bacterial response of different strains, when exposed to similar conditions, are expressed by different values of the model parameters. As a result the microbial response is characterized as a serious issue for microbial risk assessment, due to the large number of different microbial strains that can potentially contaminate a good product before its use for prediction (6).

Therefore, risk assessment cannot be performed for every potential strain using the resources available nowadays. Instead, it is limited to some bacterial strains identified as the most resistant ones and/or the ones with the highest growth potential (7). This is exactly the gap that our study wants to fill in by testing different bacterial strains and mathematical models. Risk ranking of feed/food safety and nutritional related health risks is generally recognised as the starting point for risk-based priority setting and resource allocation, as it permits policymakers to allocate their resources on the most significant public health problem (8).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Proposed objectives

In order to achieve the proposed goals, the following objectives are proposed:

A. Identification and enumeration of the most relevant pathogenic microorganisms (*Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Salmonella spp.*, *S. aureus*) in RTE cured meat of complex composition:

- A1. Determine the prevalence of the above microorganisms by food type, which have been related to national outbreaks.
- A2. Study the virulence of each pathogenic microorganism circulating on the market.
- A3. Characterise the nature and size of the microbial food safety risk.
- A4. Assess the effect of preservation treatments on the fate of pathogenic microorganisms in the final product.
- A5. Investigate the influence of physicochemical parameters (temperature, pH, water activity, NaCl) on contamination in RTE cured meat.

B. Establishment of safe conditions for moderate novel heat treatments:

- B1. Determination of the kinetics of inactivation and growth of pathogenic microorganisms in static conditions against non-thermal and moderate combined treatments.
- B2. Determination of the kinetics of inactivation and growth of pathogenic microorganisms under dynamic conditions.
- B3. Modelling the acclimation dynamics of the microorganisms.

C. Determination of sublethal damage for each of the selected microorganisms:

- C1. Growth in selective media of microorganisms exposed to damage-inducing treatments.
- C2. Pre-exposure to stress and growth conditions prior to thermal treatment could increase survival capability during processing.
- C3. Modelling of data obtained through frequency distributions and other appropriate statistical methods.

D. Analysis of the data obtained by establishing a risk prioritization or risk ranking of pathogenic microorganisms for each method evaluated in the food products:

- D1. Establishment of the most appropriate methodology in each pathogenic microorganism.

2.2 Description of samples

The samples to be used will be RTE meat products of complex composition related in outbreaks of food poisoning at Spanish/European level. Different technologies will be applied to design safe processes that allow the development of new food products.

2.3 Description of equipment

The unique instrumentation available for the development of the project consists of:

- Mastia thermoresistometer (9), available at the UPCT for the determination of microbial heat resistance in both isothermal and non-isothermal heating conditions. Working temperatures range from 20 to 150 °C and heating and cooling speeds of 40 °C / min.
- Tubular heat exchanger at pilot plant scale available at UPCT, with various sampling points along the heating section and flows around 1 L / min.
- Two bioscreen C devices for determination of bacterial growth with a high number of repetitions (up to 400 simultaneously) by optical density reading.
- Additionally, there are is a fully equipped microbiology laboratory.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The scientific methodology associated with the evaluation of microbiological risks and the prioritization of microbiological risks will be used, obtaining the microbiological and technological data necessary for their correct integration into this methodology. Based on the data

and its correct statistical analysis, safe processing and storage conditions will be established, as well as the associated critical limits.

The outcome of the project will be a robust tool for food safety management that can be implemented by all stakeholders, such as agencies related to consumer protection (EFSA, ECDC) and industry.

4. CONCLUSIONS

It has been shown that, although there are numerous scientific studies, the data available in certain areas related to emerging technologies and microorganisms are insufficient or have an inappropriate format for integration into current decision-making tools (evaluation of risks, establishing a risk prioritization or risk ranking, etc.), so it is necessary to identify these deficiencies and generate adequate data

5. AGKNOWLEDGEMENS

Leonidas Georgalis is grateful to the MINECO for awarding him a pre-doctoral grant, through Project AGL2017-86840-C2-1-R. To EFSA for awarding him an EU FORA fellowship, 2019-2020.

6. REFERENCES

1. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report [Internet]. European Food Safety Authority. 2019 [cited 2020 Jan 24]. Available from: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5926>
2. Gonano M, Hein I, Zangerl P, Rammelmayr A, Wagner M. Phenotypic and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains of veterinary, dairy and human origin. *Epidemiol Infect.* 2009;137(5):688–99.
3. Spector MP, Kenyon WJ. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Research International.* 2012;45(2):455–81.
4. Demmig-Adams B, Dumlao MR, Herzenach MK, Adams WW. Acclimation. In: Jørgensen SE, Fath BD, editors. *Encyclopedia of Ecology.* Oxford: Academic Press; 2008;15–23. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978008045405400001X>
5. Shen S, Fang FC. Integrated Stress Responses in *Salmonella*. *Int J Food Microbiol.* 2012;152(3):75–81.
6. Hassani M, Cebrián G, Mañas P, Condón S, Pagán R. Induced thermotolerance under nonisothermal treatments of a heat sensitive and a resistant strain of *Staphylococcus aureus* in media of different pH. *Letters in Applied Microbiology.* 2006;43(6):619–24.
7. Garre A, Egea JA, Iguaz A, Palop A, Fernandez PS. Relevance of the Induced Stress Resistance When Identifying the Critical Microorganism for Microbial Risk Assessment. *Front Microbiol.* 2018;9:1663. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01663/full?utm_source=Email_to_authors&utm_medium=Email&utm_content=T1_11.5e1_author&utm_campaign=Email_publication&field=&journalName=Frontiers_in_Microbiology&id=386328
8. Fels-Klerx HJ van der, Asselt ED van, Raley M, Poulsen M, Korsgaard H, Bredsdorff L, et al. Critical review of methodology and application of risk ranking for prioritisation of food and feed related issues, on the basis of the size of anticipated health impact. *EFSA Supporting Publications.* 2015;12(1):710E.
9. Conesa R, Andreu S, Fernández PS, Esnoz A, Palop A. Nonisothermal heat resistance determinations with the thermoresistometer Mastia. *Journal of Applied Microbiology.* 2009;107(2):506–13.

Crops association in horticulture to increase agricultural productivity and ecosystem services

Asociación de cultivos en horticultura para incrementar la productividad agraria y los servicios ecosistémicos

M. Marcos*, R. Zornoza, V. Sanchez

Grupo de Gestión, Aprovechamiento y Recuperación de Suelos y Agua, Departamento de Ingeniería Agronómica, ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena. Spain.

*mariano.marcos@upct.es

Abstract

The proposed research study has the objective to assess the effect of different combinations and patterns of intercropping between vegetables from the Mediterranean basin of Spain, such as broccoli in winter (*Brassica oleracea italica*) and melon in summer (*Cucumis melon*), and legume species such as fava bean in winter (*Vicia faba*) and cowpea in summer (*Vigna unguiculata*), with incorporation of crop residues as green manure, reduction of the tillage depth and reduction in the use of external inputs in the crop yield, agro-ecosystem productivity, incidence of pests and release of ecosystem services (biodiversity, soil quality and carbon sequestration). This will be done during three crop cycles, evaluating the combinations with highest facilitation and complementarity between the species. For this purpose, individual crops of broccoli and melon will be compared in systems intercropped with fava bean and cowpea, assessing the effect of row intercropping (1:1 and 2:1) and mix intercropping. At the end of each cycle yield, land equivalent ratio and crop quality will be recorded. A soil sampling will be also performed at the end of each cycle to check if intercropping contributes to increase nutrients, improve soil structure and carbon sequestration.

Keywords: intercropping; production; carbon sequestration; fertility; biodiversity; soil quality.

Resumen

El proyecto de investigación propuesto tiene como objetivo evaluar el efecto de diferentes combinaciones y patrones de cultivos simultáneos asociados entre cultivos hortícolas típicos de la cuenca mediterránea española como es el brócoli en invierno (*Brassica oleracea italica*) y el melón en verano (*Cucumis melo*) y especies leguminosas como el haba en invierno (*Vicia faba*) y el judía de careta en verano (*Vigna unguiculata*), con incorporación de los residuos vegetales como abono verde, la reducción de la profundidad del arado y la reducción en el uso de insumos externos en el rendimiento de las cosechas, la producción general del agro-ecosistema, la incidencia de plagas y los servicios ecosistémicos (biodiversidad, calidad de suelo y secuestro de carbono) durante tres ciclos de cultivo, determinando las combinaciones con mayor facilitación y complementariedad entre las especies utilizadas. Para ello se van a comparar cultivos individuales de brócoli o melón con sus asociaciones con haba y caupí en filas alternas 1:1, filas alternas 2:1 o mezclado en la misma fila. Al final de cada ciclo se determinará la producción, la relación equivalente del terreno y la calidad de la cosecha.

Palabras clave: cultivos simultáneos; producción; secuestro de carbono; fertilidad; biodiversidad; calidad edáfica.

1. INTRODUCCIÓN

La reciente intensificación de la agricultura basada en monocultivos, la intensa mecanización y el uso excesivo de insumos externos ha conducido a un incremento del rendimiento de los cultivos en España y en Europa, pero también ha conducido a la degradación de los suelos, contaminación de las aguas, reducción de la biodiversidad, incremento en la incidencia de enfermedades y plagas y a un descenso en la sostenibilidad de los sistemas agrarios a largo plazo, con el asociado riesgo económico para los agricultores (1). Como consecuencia, la principal necesidad de la horticultura moderna es afrontar dos retos que parecen contradictorios, como es producir alimentos con incrementos en la productividad de los agro-ecosistemas y la minimización del impacto ambiental negativo asociado a los actuales sistemas de producción (2). Además, el incremento de la productividad del agro-ecosistema asociado con un descenso de los costes de producción y costes ambientales podría contribuir a un crecimiento del sector agrícola a través de la adaptación a nuevos sistemas de cultivo diversificado (3).

La asociación de cultivos o uso de cultivos simultáneos es una práctica de diversificación en la que se hacen crecer dos o más cultivos simultáneamente en la misma área (3). El uso de asociaciones de cultivos, si está correctamente planteada, ha conducido a una producción combinada por unidad de área mayor que los monocultivos (rendimiento relativo total y relación equivalente del terreno (LER) > 1). Esto se debe a que el uso de cultivos simultáneos puede incrementar la resistencia y resiliencia del agro-ecosistema a las perturbaciones (sequía, inundación, enfermedad, pestes, disponibilidad de nutrientes, contaminación) (4) mediante la complementariedad en el uso de recursos entre las especies y procesos de facilitación interespecífica (5).

El uso de asociaciones de cultivos con diferentes requerimientos nutricionales en el tiempo y en el espacio ha servido para reducir el uso de fertilizantes externos, ya que se ha observado un incremento en la actividad microbiana que favorece la solubilización de nutrientes como el potasio, el calcio o el hierro que estaban precipitados (6,7). Por otro lado, cuanto mayor es la diversidad en las asociaciones de cultivos, más compleja y diversa es la estructura microbiana e invertebrada edáfica y mayor es la tasa de mineralización y solubilización de nutrientes (8).

Aunque el uso de rotaciones en agricultura es bastante extensivo en la literatura científica como sistema de cultivo diversificado, las asociaciones de cultivos simultáneos no han sido ampliamente estudiadas debido a su mayor complejidad. La mayor parte de estudios encontrados sobre asociaciones de cultivos simultáneos en cultivos anuales versan sobre la mezcla de cereal y leguminosas (3,6,7,9,10), pero muy pocos sobre las interacciones entre diferentes cultivos simultáneos hortícolas (11,12). Además, la mayor parte de asociaciones de cultivos en horticultura se basan en el uso de cubiertas sin ningún aprovechamiento económico, solo como beneficio ambiental. En este sentido, aún hay poco conocimiento sobre los mecanismos de complementariedad y facilitación entre asociaciones de cultivos aprovechables económicamente en horticultura para incrementar la productividad, y los servicios ecosistémicos, y reducir la incidencia de plagas.

El objetivo general de la tesis es evaluar el efecto de diferentes combinaciones y patrones de cultivos asociados entre cultivos hortícolas típicos de la cuenca mediterránea española como es el brócoli en invierno (*Brassica oleracea italica*) y el melón en verano (*Cucumis melo*) y especies leguminosas como el haba en invierno (*Vicia faba*) y el caupí en verano (*Vigna unguiculata*), con incorporación de los residuos vegetales como abono verde, la reducción del arado a 15-20 cm de profundidad y la reducción en el uso de insumos externos en el rendimiento de las cosechas, la producción general del agro-ecosistema, la incidencia de plagas y los servicios ecosistémicos (biodiversidad, calidad y fertilidad de suelo y secuestro de carbono) durante tres ciclos de cultivo, determinando las combinaciones con mayor facilitación y complementariedad entre las especies utilizadas. Es necesario replicar el experimento durante al menos tres ciclos de cultivo porque los

cambios en el suelo y la biodiversidad no son rápidos, y se necesitan varios ciclos para tener resultados concluyentes.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Este proyecto se llevará a cabo en la finca Tomás Ferro de la UPCT en Cartagena. Se compararán los monocultivos de las especies de verano (melón-caupí) e invierno (brócoli-haba) con sus diferentes sistemas de cultivo asociado: cultivo asociado en filas 1:1 (hortícola:leguminosa), cultivo asociado en filas 2:1 (hortícola:leguminosa) y cultivos alternados en la misma fila (mix). Tanto el monocultivo como los sistemas asociados cuentan con tres repeticiones y cada repetición se establece en una parcela de 120 m². La densidad de siembra varía según el sistema de cultivo y tipo de cultivo. Se ha realizado un 30 % de disminución en la tasa de fertilización nitrogenada en los sistemas asociados para evaluar el efecto positivo de la asociación de la especie leguminosa para reducir el uso de fertilizantes externos. Se van a estudiar estas combinaciones durante tres ciclos de cultivo. Se va a realizar un seguimiento de la incidencia de enfermedades y plagas para ver si hay algún efecto de la asociación de cultivos. Además, cuando la leguminosa esté en flor, se muestrearán al azar diferentes plantas por parcela para evaluar la fijación biológica de nitrógeno mediante el método de N¹⁵ de abundancia natural. Además, se determinará la producción de cada especie y diferentes indicadores de calidad de la cosecha como contenido de proteínas y peso kernel en las legumbres, o grados brix en el melón. Tras la cosecha se realizará un muestreo de suelo, tomando tres muestras compuestas por parcela al azar a dos profundidades (0-10 cm y 10-30 cm), donde se analizarán diferentes propiedades físicas, químicas y microbiológicas. Además, durante cada ciclo de cultivo se realizará un seguimiento semanal de las emisiones de gases de efecto invernadero mediante el método de la cámara dinámica.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados esperados son que el uso de la asociación de cultivos en horticultura con leguminosas con prácticas de manejo sostenibles basadas en la incorporación de los residuos vegetales como abono verde, la reducción del arado a 15 cm de profundidad y la reducción del uso de fertilizantes al fomentar la fijación biológica de N y la solubilización y mineralización de nutrientes en el suelo, incremente la resiliencia del sistema agrario, la productividad general del agro-ecosistema y su sostenibilidad mediante la reducción en la incidencia de plagas, el incremento de la calidad y fertilidad de suelo, el secuestro de carbono en el suelo y la biodiversidad microbiana, faunística y vegetal. La producción por unidad de área del sistema con asociación de cultivos deberá ser mayor que la producción de cada cultivo por separado, dependiendo de los patrones de combinación de los cultivos asociados, ya que debe maximizarse la facilitación y complementariedad entre las especies y minimizar la competencia. Todo ello asociado a la mitigación del cambio climático con la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero directamente desde el suelo, e indirectamente por la reducción del uso de fertilizantes nitrogenados.

4. CONCLUSIONES

Con este trabajo de investigación se espera obtener una alternativa viable para una producción sostenible de hortalizas mediante el uso de sistemas de cultivos asociados, que aumente el rendimiento y la calidad de la cosecha, que reduzca la incidencia de plagas a través del aumento de la biodiversidad de la entomofauna, que aumente la biodiversidad microbiana, así

como su fertilidad y estructura. Además, esta estrategia se espera que ayude a mitigar la emisión de gases de efecto invernadero.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AsociaHortus [AGL2017-83975-R] del Ministerio de Ciencia Innovación y Universidades. Mariano Marcos Pérez agradece la financiación del Ministerio de Ciencia Innovación y Universidades a través de las ayudas para contratos predoctorales para la formación de doctores 2018 [PRE2018-085702].

6. REFERENCIAS

1. Joint Research Centre (JRC). The state of the soil in Europe. European Commission, Luxemburgo. 2012. https://www.google.es/search?source=hp&ei=2JGyXvy_Osq6kgXZ9JWwCA&q=Joint+Research+Centre+%28JRC%29%2C+2012.+The+state+of+the+soil+in+Europe.+European+Commission%2C+Luxemburgo.&oq=Joint+Research+Centre+%28JRC%29%2C+2012.+The+state+of+the+soil+in+Europe.+European+Commission%2C+Luxemburgo.&gs_lcp=CgZwc3ktYWIQA1CsA1isA2CkCWgAcAB4AIABaYgBaZIBAzAuMZgBAKABAqABAaoB B2d3cy13aXo&scient=psy-ab&ved=0ahUKEwj8i90PhJ_pAhVKnaQKHVl6BYYQ4dUDCAg&uact=5
2. Duhamel M, Vandenkoornhuysen P. Sustainable agriculture: Possible trajectories from mutualistic symbiosis and plant neodomestication. *Trends Plant Sci.* 2013;18(11):597–600.
3. Mao LL, Zhang LZ, Zhang SP, Evers JB, van der Werf W, Wang JJ, et al. Resource use efficiency, ecological intensification and sustainability of intercropping systems. *J Integr Agric.* 2015;14(8):1542–50.
4. Lin BB. Resilience in Agriculture through Crop Diversification: Adaptive Management for Environmental Change. *Bioscience.* 2011;61(3):183–93.
5. Franco JG, King SR, Masabni JG, Volder A. Plant functional diversity improves short-term yields in a low-input intercropping system. *Agric Ecosyst Environ.* 2015;203:1–10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2015.01.018>
6. Latati M, Bargaz A, Belarbi B, Lazali M, Benlahrech S, Tellah S, et al. The intercropping common bean with maize improves the rhizobial efficiency, resource use and grain yield under low phosphorus availability. *Eur J Agron.* 2016;72:80–90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eja.2015.09.015>
7. Łukowiak R, Grzebisz W, Sassenrath GF. New insights into phosphorus management in agriculture - A crop rotation approach. *Sci Total Environ.* 2016;542:1062–77.
8. Njeru EM, Avio L, Bocci G, Sbrana C, Turrini A, Bärberi P, et al. Contrasting effects of cover crops on 'hot spot' arbuscular mycorrhizal fungal communities in organic tomato. *Biol Fertil Soils.* 2015;51(2):151–66.
9. Hijri I, Sýkorová Z, Oehl F, Ineichen K, Mäder P, Wiemken A, et al. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. *Mol Ecol.* 2006;15(8):2277–89.
10. Jiao H, Chen Y, Lin X, Liu R. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in greenhouse soils continuously planted to watermelon in North China. *Mycorrhiza.* 2011;21(8):681–8.
11. Yildirim E, Guvenc I. Intercropping based on cauliflower: More productive, profitable and highly sustainable. *Eur J Agron.* 2005;22(1):11–8.
12. Demir H, Polat E. Effects of broccoli-crispy salad intercropping on yield and quality under greenhouse conditions. *African J Agric Res.* 2011;6(17):4116–21.

Design of an efficient model to increase shelf life of fruit and vegetable products and reduce food waste in the supply chain

Diseño de un modelo eficiente para el aumento de la vida útil de productos hortofrutícolas y la reducción del desperdicio alimentario en la cadena de suministro

A. Cánovas^{1,2*}, E. Hontoria³, J.A. Egea⁴, E. Aguayo^{1,2}

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

²Unidad de Calidad Alimentaria y Salud, Instituto de Biotecnología Vegetal, Edificio I+D+I, UPCT, Campus Muralla del Mar, 30202 Cartagena, Spain.

³Departamento de Economía de la Empresa, UPCT, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena. Spain.

⁴Departamento de Mejora Vegetal, CEBAS-CSIC, Campus Univeristario de Espinardo, 30100 Murcia. Spain.

*alcaher.95@gmail.com

Abstract

This research will study the variables of transport of fresh fruit and vegetable products. The main objective is the design of models to optimize transport and help in the decision-making process. The overall objective is to preserve quality and shelf-life of the transported products.

Keywords: shelf-life; modelling; quality; road transport.

Resumen

Esta investigación estudiará las variables del transporte de productos hortofrutícolas frescos. El principal objetivo es el de diseñar modelos que permitan una optimización del transporte y una adecuada toma de decisiones, para en última instancia, mantener la calidad y la vida útil de los productos transportados.

Palabras clave: vida útil; modelización; calidad; transporte por carretera.

1. INTRODUCCIÓN

El sector hortofrutícola nacional representa el 40 % de la producción agraria y el 30 % del consumo alimenticio total español. De esta producción, entre el 92 y el 95 % se exporta a la UE (13.000 millones de €), siendo Alemania, Francia y Reino Unido los principales destinos. Para ello, el transporte por carretera es el modo más utilizado. El transporte y distribución son operaciones unitarias de gran importancia e impacto en la calidad postcosecha y coste del producto fresco hortofrutícola (1).

Los productos hortícolas son organismos vivos y, como tales, son productos muy perecederos con una vida postcosecha relativamente corta, muy influenciada por factores intrínsecos (tipo producto, variedad, fertilización, etc.) y factores extrínsecos (T^a , HR, etileno, O_2 , CO_2 , vibraciones, etc.) de cada una de las etapas que componen la cadena de suministro (2).

En este sector hortofrutícola, el binomio producción agrícola-transporte se caracteriza por una alta competitividad, márgenes estrechos y unas exigencias de los clientes en cuanto a calidad, trazabilidad y KPI's (*key performance indicators*) cada vez más elevadas. Además, aparecen nuevas variables como el interés de las compañías de presentar una imagen más "verde" en sintonía con las demandas sociales. Entre ellas, la huella de carbono o la reducción del desperdicio son conceptos que cada vez nos suenan más. En el contexto del transporte y distribución, donde definimos las variables tiempo de entrega, costes, calidad del producto, trazabilidad, así como las ambientales (emisiones y desperdicios) como las más importantes (1).

La pérdida de recursos naturales no es sostenible y pone en peligro el ecosistema. La producción de alimentos causa emisiones de gases de efecto invernadero en todas las etapas de la cadena de suministro de alimentos. Por otro lado, la producción de nuestro sector de frutas y hortalizas (F&H) alcanza los 27,8 millones de t, la importancia social de este sector en los últimos años se refleja por el aumento de las exportaciones (12.486 mil €) y la generación de empleo directo (280.000 trabajadores) (3).

Sin embargo, a pesar del gran impacto económico, social y ambiental que tiene este sector en nuestro país, apenas disponemos de estudios rigurosos que analicen la cadena de valor de F&H y mucho menos que se centren en el transporte y la logística. La mayor parte de la investigación se ha abordado de forma inconexa, sin una apreciación completa de las complejas interacciones e interdependencias entre la fisiología postcosecha de F&H, la logística y la gestión de la cadena de suministro de este sector.

Las herramientas tradicionales de la logística basadas en el mundo analógico, tipo *cross-docking* u otras, no resuelven los modernos problemas planteados en la Logística 4.0. Esto no significa que no aporten valor, sino que su optimización ha alcanzado tal límite que apenas aportan eficiencia adicional necesitándose nuevos modelos innovadores, disruptivos, con capacidad de instalarse en una cadena de suministro en plena transformación digital y que impacten en las anteriores variables clave (1).

Con el objetivo de dar respuesta a los retos actuales de la sociedad, en particular en el transporte y logística, la aplicación de modelos de optimización, el análisis del *big data* mediante *machine learning* y la aplicación de metodologías colaborativas para mejorar la trazabilidad y hacer más segura la cadena de suministro, se traducen en la reducción del lead total del primer eslabón a cliente final, con lo que impactamos en los objetivos clave: tiempo, costes y una mejor calidad del producto que se traducirán en una reducción del desperdicio y, por tanto, en una menor huella de carbono (4).

Esta tesis doctoral tiene como objetivo diseñar modelos que permitan una optimización del transporte y una adecuada toma de decisiones. Se trabajará con diversas F&H estudiando las condiciones de transporte y distribución en condiciones simuladas y reales. Este objetivo general se divide en los siguientes objetivos específicos:

- 1) Conocer los parámetros más importantes que afectan a la calidad postcosecha y vida útil de productos hortofrutícolas frescos durante su transporte y distribución.
- 2) Conocer las variables extrínsecas (T^a , HR, gases, vibraciones, etc.) que influyen en la vida útil de productos hortofrutícolas durante su transporte, llegando a una estimación dinámica de las mismas.
- 3) Calcular el coste e impacto ambiental del transporte y distribución de los productos hortofrutícolas frescos, teniendo en cuenta su redistribución o descarte cuando no cumplen con los parámetros de calidad.
- 4) Definir estrategias de optimización del transporte y distribución, en particular, cuando los productos presentan una mínima calidad hortofrutícola.

- 5) Modelización de las variables extrínsecas e intrínsecas que afectan a la calidad y transporte de los productos hortofrutícolas para apoyar la toma de decisiones en tiempo real.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para lograr los objetivos propuestos se seguirá el siguiente plan.

2.1 Calidad postcosecha

Se determinarán los parámetros fisicoquímicos que más influyen en la calidad: Color (Colorímetro Minolta), firmeza (penetrometría con un texturómetro), sólidos solubles totales (refractómetro Atago), deshidratación (escala hedónica), calidad sensorial (panel de cata y escala hedónica), un parámetro funcional representativo de la fruta u hortaliza a analizar.

2.2 Evaluación de las variables extrínsecas en el transporte

En relación con las variables extrínsecas (temperatura, humedad relativa, gases, vibraciones, etc.) que influyen en la vida útil del producto durante su transporte, se analizará proveedores de equipos sensoriales susceptibles de captar, medir y enviar la señal a distancia y en tiempo real. Así mismo, se seleccionará un proveedor de transporte que permita la colocación de dichos sensores en transporte propio, facilitando su recogida en el cliente final.

2.3 Modelización

En relación con herramientas de modelización, se utilizarán técnicas de programación matemática e investigación operativa para optimizar rutas, itinerarios y encontrar condiciones óptimas de transporte en función del tipo de producto(s). Dada la naturaleza multifactorial de los procesos relacionados con la calidad en general, la ausencia de modelos mecanísticos y la necesidad de disponer de información *on-line*, se hará uso de métodos de *machine learning* y minería de datos con una fase previa de entrenamiento en base a datos históricos ya recopilados.

3. RESULTADOS

Los resultados esperados de la tesis consisten en desarrollar un modelo de transporte que mantenga la calidad y alargue la vida útil de los productos hortícolas frescos transportados e implantar una herramienta que facilite la toma de decisiones en tiempo real en el transporte y distribución de productos hortícolas frescos.

4. CONCLUSIÓN

En esta tesis doctoral, se espera contribuir a la reducción del desperdicio alimentario mediante el conocimiento de la calidad postcosecha de los productos hortícolas frescos adaptándola al mercado destino. Además, la validación de un modelo que apoye la toma de decisiones en tiempo real, adquiriendo información de modelos predefinidos y de sensores a lo largo de toda la cadena de distribución, contribuirá a una optimización de la gestión de los factores que afectan a la calidad postcosecha.

5. AGRADECIMIENTOS

A las empresas que van a colaborar en el desarrollo de esta investigación.

6. REFERENCIAS

1. Hontoria E. En busca de la excelencia en la logística de perecederos. Elvigia.com. 2020 [cited 23 July 2020]. <http://elvigia.com/en-busca-de-la-excelencia-en-logistica-de-perecederos/>
2. Plà-Aragonés L. Handbook of Operations Research in Agriculture and the Agri-Food Industry. 1st ed. New York, NY: Springer; 2015.
3. Aguayo E. En busca de la eficiencia del sector hortofrutícola [Internet]. La Verdad. 2020 [cited 23 July 2020]. <https://www.laverdad.es/ababol/ciencia/busca-eficiencia-sector-20190608003642-ntvo.html>
4. Ahumada O, Villalobos J. Operational model for planning the harvest and distribution of perishable agricultural products. *International Journal of Production Economics*. 2011;133(7):677-87.
5. Abdella G, Kucukvar M, Onat N, Al-Yafay H, Bulak M. Sustainability assessment and modeling based on supervised machine learning techniques: The case for food consumption. *Journal of Cleaner Production*. 2020; 251:119661.
6. Brown W, Ryser E, Gorman L, Steinmaus S, Vorst K. Transit temperatures experienced by fresh-cut leafy greens during cross-country shipment. *Food Control*. 2016;61:146-55.
7. Kovačić D, Hontoria E, Ros-McDonnell L, Bogataj M. Location and lead-time perturbations in multi-level assembly systems of perishable goods in Spanish baby food logistics. *Central European Journal of Operations Research*. 2014;23(2):607-23.
8. Rong A, Akkerman R, Grunow M. An optimization approach for managing fresh food quality throughout the supply chain. *International Journal of Production Economics*. 2011;131(5):421-9.
9. Soto-Silva W, Nadal-Roig E, González-Araya M, Pla-Aragonés L. Operational research models applied to the fresh fruit supply chain. *European Journal of Operational Research*. 2016;251(7):345-55.

Relationship of the shelf life of fruits with the content of water and mineral nutrients

Relación de la vida útil de frutos con el contenido de agua y nutrientes minerales

F.J. Quirante Moya^{1*}, M. Carvajal¹, M.C. Martínez Ballesta²

¹Grupo aquaporinas, Departamento de Nutrición Vegetal, CEBAS-CSIC, Campus Universitario de Espinardo, 30100 Murcia. Spain.

²Grupo de Hortofloricultura Mediterránea, Departamento de Ingeniería Agronómica, ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena. Spain.

*fquirantemoya@cebas.csic.es

Abstract

The doctoral thesis aims to study the physiological and molecular mechanisms that influence the turgor and firmness of the fruits, as well as their shelf life, identifying at the agronomic level the existence or not of molecular markers, the nutrition of Calcium and Boron will be adapted to the tree nutrition to influence the firmness of the fruits and the quality of the final product. Therefore, different foliar treatments will be directly tested in the field, checking their effectiveness, which it will allow to improve fruit quality and increase their shelf life.

Keywords: *Prunus* sp.; aquaporins; post-harvest; calcium; boron.

Resumen

La tesis doctoral pretende estudiar los mecanismos fisiológicos y moleculares que influyen en el turgor y la firmeza de los frutos, así como en su vida útil. Pudiendo identificar a nivel agronómico la existencia o no de marcadores moleculares, se adaptará la nutrición de Calcio y Boro en el árbol para incidir en la firmeza de los frutos que, en su caso, repercutirá en la calidad del producto final. Se ensayarán de forma directa en campo diversos tratamientos foliares comprobando su eficacia, lo cual nos permitirá mejorar la calidad de los frutos con el consiguiente incremento de su vida útil.

Palabras clave: *Prunus* sp.; acuaporinas; post-cosecha; calcio; boro.

1. INTRODUCCIÓN

Prunus es un género perteneciente a la familia de las *Rosaceae*. Entre las 19 especies que componen este género, podemos encontrar algunas de elevado valor agronómico, como: melocotonero (*Prunus persica*), nectarino (*Prunus persica* var. Nectarina), paraguayo (*Prunus persica* var. platycarpa), almendro (*Prunus dulcis*), ciruelo (*Prunus domestica* L.), albaricoquero (*Prunus armeniaca*), cerezo (*Prunus avium*). En España, en el año 2018, la extensión de su cultivo abarcó más de 770.000 ha y su producción ascendió hasta 1.340.005 t. En 2016, su cultivo aportó más de 1.300 millones de € (1). Son frutos climatéricos y como tal, se ha detectado que la expresión de factores de insensibilidad y de respuesta al etileno podría estar modulando la producción del mismo (2), afectando al tiempo que conservan sus propiedades fisiológicas y organolépticas tras la cosecha.

Las acuaporinas, implicadas en la formación del fruto, son estructuras proteicas pertenecientes a la familia MIP (Proteínas Intrínseca de Membrana), que permiten el paso del agua libremente a través de las membranas celulares a favor de gradientes de presión osmóticos o hidrostáticos (3). Tradicionalmente se han clasificado en función de su composición aminoacídica y de su localización celular, dando como resultado distintas sub-familias, siendo la más grande la sub-familia PIP. Además, existen evidencias de que el flujo de iones está relacionado con la conductividad hidráulica de las membranas y la actividad de las acuaporinas (4). También se ha observado que la planta es capaz de regular la funcionalidad y expresión de acuaporinas, en situaciones de diferentes tipos de estrés (5). La activación/desactivación de algunas acuaporinas se produce por cascadas de fosforilación/desfosforilación, regulada por el calcio citoplásmico, a través de su interacción con una proteína quinasa (6).

De esta manera, la concentración de calcio en la disolución nutritiva puede determinar el restablecimiento de la conductancia hidráulica de las raíces (7). Además, el calcio y el potencial hídrico del apoplasto son responsables de la fosforilación de algunas acuaporinas (8); y se ha sugerido un papel del calcio citosólico en la regulación del turgor (9). El boro juega un papel clave en la función de la pared celular de la planta y bajos niveles de boro reducen su capacidad para la absorción de agua y nutrientes, lo que a menudo provoca a la vez una deficiencia de calcio (10). El principal problema en la nutrición de boro y calcio es la falta de movilidad en suelos y la planta, lo que dificulta su traspaso de la hoja a los frutos. Existen estudios de los beneficios de la aplicación foliar de B en los cultivos (11).

El objetivo principal es establecer un protocolo de aplicación de nutrientes vía foliar (Ca y B) para evitar las pérdidas de agua por los frutos y el mantenimiento de las estructuras celulares. Para ello se abordarán los objetivos parciales: 1) caracterizar la absorción y transporte de agua a través de los árboles; 2) estudiar el efecto de los tratamientos nutricionales sobre el paso del agua a través de las hojas a los frutos; 3) estudiar la implicación y respuesta de las acuaporinas en las hojas y en los frutos para determinar su relación con la firmeza y la vida útil, y 4) incrementar la absorción de calcio y B y el transporte de agua a la parte aérea del árbol y al fruto relacionándolos con la actividad de las acuaporinas y el turgor de las células del fruto.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cultivos y diseño experimental

Aplicación experimental en campo de los tratamientos previamente testados en condiciones controladas. El spray foliar se suministra en la fase de cuaje de fruto, un total de dos difusiones. Las especies objeto de estudios son: *Prunus persica*, *Prunus persica* var. *platycarpa*, *Prunus armeniaca* y *Prunus avium*. Sobre ellos se aplicaron un total de 7 tratamientos, manteniendo un octavo cultivo en condiciones de cultivo estándar. Los minerales aportados por los distintos tratamientos son: 1) Calcio (Ca); 2) Calcio+ Boro (Ca + B); 3) Calcio + Silicio (Ca + Si); 4) Calcio + Proteína (Ca + Prot); 5) Calcio + Boro + Proteína (Ca + B + Prot); 6) Calcio + Silicio + Proteína (Ca + Si + Prot) y 7) Proteína (Prot).

2.2 Determinaciones Analíticas

2.2.1 Conductancia hidráulica (L_0), Potencial osmótico y turgor de los frutos

L_0 se medirá con la bomba de Scholander. El potencial osmótico determinará mediante valoración con un osmómetro. El turgor de los frutos se analizará mediante la sonda de presión celular.

2.2.2 Crecimiento

Se determinará por medio del desarrollo de los frutos (peso fresco y seco).

2.2.3 Análisis de nutrientes en fruto

Los aniones se analizarán por cromatografía iónica y los cationes por ICP.

2.2.4 Análisis de la eficiencia en el uso del agua y nutrientes

Se calculará mediante la relación entre la absorción de agua y la de los nutrientes con la fijación de carbono.

2.2.5 Análisis de la integridad de membrana del fruto

Se usará la técnica histológica de tinción de Evans Blue (12) y el Índice de estabilidad de la membrana analizando la fuga de electrolitos a través de la membrana.

2.2.6 Análisis metabólico

Se realizará un análisis de aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos, etc..., y se relacionarán con los efectos fisiológicos. Se determinará por análisis dirigido por espectrometría de masas acoplado a HPLC.

2.2.7 Expresión de AQPs

Se realizará usando cebadores específicos de las subfamilias PIP1 y PIP2 de acuaporinas y RT-PCR cuantitativa a tiempo real.

2.2.8 Calidad físico química y sensorial de los frutos

Se determinará el contenido en sólidos solubles (SSC), pH y determinación de acidez titulable (TA) expresada en porcentaje de ácido cítrico. El Color de los frutos se determinará empleando un colorímetro calculando el índice de color (13). Los análisis sensoriales se realizarán de acuerdo con las normas internacionales en una habitación estándar.

2.2.9 Firmeza

La firmeza se determinará con un texturómetro midiendo la cantidad de fuerza (N) para pinchar 8 mm de profundidad (sonda de 4 mm de diámetro).

2.2.10 Incidencia de decaimiento

La incidencia de decadencia se expresará como un porcentaje de fruta infectada relacionada con el número inicial de fruta (14).

2.2.11 Análisis microbiológico

Las cargas microbianas se analizarán tal y como ha descrito anteriormente (15). Se realizarán recuentos de levadura y mohos, microorganismos mesofílicos y psicotróficos, enterobacterias hasta un periodo de 2 semanas de almacenamiento.

2.2.12 Análisis de enzimas de degradación de la pared celular

Se determinará el peso de la pared celular de los frutos y actividades enzimáticas pectinmetilesterasa y poligalacturonasa.

3. RESULTADOS

Entre los resultados esperados destaca la determinación y caracterización de los mecanismos de transporte de agua y nutrientes hacia el fruto, así como la caracterización de acuaporinas implicadas en dichos procesos. Se caracterizarán además los procesos fisiológicos que determinan el crecimiento y madurez de los frutos y la relación de su vida útil con la degradación de la pared celular a través de la caracterización de algunas de las enzimas

implicadas. Se establecerá un protocolo de nutrición foliar que permita mejorar la calidad y aumentar la vida útil de los frutos, mejorando sus propiedades de membrana y de pared celular.

4. CONCLUSIONES

Los ensayos preliminares han derivado en los tratamientos actuales donde se prevé clarificar la implicación de iones como Ca y B, en el transporte de agua y calidad del fruto.

5. AGRADECIMIENTOS

Francisco José Quirante Moya ha sido financiado por CEBAS-CSIC en el marco de un contrato CDTI con referencia 090202190226- FÉNIX FRESH.

6. REFERENCIAS

1. FAOSTAT. Value of Agricultural Production. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QV>
2. Zhou H, Zhao L, Yang Q, Amar MH, Ogutu C, Peng Q, et al. Identification of EIL and ERF genes related to fruit ripening in peach. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8):1–15.
3. Maurel C, Boursiac Y, Luu DT, Santoni V, Shahzad Z, Verdoucq L. Aquaporins in plants. *Physiol Rev.* 2015;95(4):1321–58.
4. Carvajal M, Cooke DT, Clarkson DT. Responses of wheat plants to nutrient deprivation may involve the regulation of water-channel function. *Planta.* 1996;199(3):372–81.
5. Li G, Santoni V, Maurel C. Plant aquaporins: Roles in plant physiology. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2014;1840(5):1574–82.
6. Gerbeau P, Amodeo G, Henzler T, Santoni V, Ripoche P, Maurel C. The water permeability of Arabidopsis plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. *Plant J.* 2002;30(1):71–81.
7. Shokat S, Großkinsky DK. Tackling salinity in sustainable agriculture-What developing countries may learn from approaches of the developed world. *Sustain.* 2019;11(17).
8. Maurel C, Verdoucq L, Luu D-T, Santoni V. Plant Aquaporins: Membrane Channels with Multiple Integrated Functions. *Annu Rev Plant Biol.* 2008;59(1):595–624.
9. Chaumont F, Tyerman S. Plant aquaporins: From transport to signaling. 2017;354.
10. Del Carmen Rodríguez-Hernández M, Moreno DA, Carvajal M, Del Carmen Martínez Ballesta M. Interactive effects of boron and NaCl stress on water and nutrient transport in two broccoli cultivars. *Funct Plant Biol.* 2013;40(7):739–48.
11. Krishna H, Das B, Attri BL, Kumar A, Ahmed N. Interaction between different pre- and postharvest treatments on shelf life extension of 'Oregon Spur' apple. *Fruits.* 2012;67(1):31–40.
12. Shi Y, Zhang Y, Han W, Feng R, Hu Y, Guo J, et al. Silicon enhances water stress tolerance by improving root hydraulic conductance in *solanum lycopersicum* L. *Front Plant Sci.* 2016;7(FEB2016):1–15.
13. Pathare PB, Opara UL, Al-Said FAJ. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food Bioprocess Technol.* 2013;6(1):36–60.
14. Álvarez-Hernández MH, Martínez-Hernández GB, Avalos-Belmontes F, Castillo-Campohermoso MA, Contreras-Esquível JC, Artés-Hernández F. Potassium Permanganate-Based Ethylene Scavengers for Fresh Horticultural Produce as an Active Packaging. *Food Eng Rev.* 2019;11(3):159–83.
15. Navarro-Rico J, Artés-Hernández F, Gómez PA, Núñez-Sánchez MÁ, Artés F, Martínez-Hernández GB. Neutral and acidic electrolysed water kept microbial quality and health promoting compounds of fresh-cut broccoli throughout shelf life. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2014;21:74–81.

Extra virgin olive oil microencapsulation. Effect on quality and shelf life of breaded foods

Microencapsulación del aceite de oliva virgen extra. Efecto sobre la calidad y vida útil de alimentos empanados

M. Barón-Yusty*, M. Ros-Chumillas, G.B. Martínez-Hernández, A. López-Gómez

Grupo de Ingeniería del Frío y la Seguridad Alimentaria, Departamento de Ingeniería Agronómica, ETISA, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena. Spain.

*marta.baron@edu.upct.es

Abstract

This PhD Thesis aims to develop an innovative technology for manufacturing refrigerated pre-fried breaded foods avoiding the (deep) pre-frying operation. This technology incorporates extra virgin olive oil (EVOO) microencapsulated in cyclodextrins in the breading or battering step. EVOO microencapsulation will be studied with two carriers or encapsulation agents (α -cyclodextrin & γ -cyclodextrin) using the microencapsulation process of kneading. This study plans on fulfilling today's consumer's needs, through the development and execution of a new technology at laboratory and pilot plant scale (without deep pre-frying operation in oil) that obtains a healthier breaded food with the same sensory characteristics of a fried breaded food.

Keywords: cyclodextrins; oil-free frying; healthiness; quality.

Resumen

Esta Tesis doctoral tiene por objetivo desarrollar una innovación tecnológica en la elaboración de alimentos empanados refrigerados que consiste en la eliminación de la operación de pre-fritura en aceite, y la introducción de aceite de oliva virgen extra (AOVE) microencapsulado en la etapa de empanado o rebozado. La microencapsulación del AOVE se estudiará usando dos "carriers" o agentes de encapsulación (α -ciclodextrinas y γ -ciclodextrinas) usando el proceso de microencapsulación por amasado y liofilización. El estudio de esta nueva metodología que será desarrollada a escala de laboratorio y planta piloto (sin operación de pre-fritura con aceite) está orientado a satisfacer las necesidades actuales de los consumidores, ya que tratará de lograr un producto (sin freír) mucho más saludable y con las mismas características sensoriales del producto empanado frito.

Palabras clave: ciclodextrinas; fritura sin aceite; saludable; calidad.

1. INTRODUCCIÓN

La demanda creciente de productos alimenticios más sostenibles y saludables que los tradicionales suponen un reto para las industrias alimentarias (1,2) al tener que reaccionar y adaptarse, de diversas maneras, para abordar las necesidades actuales de los consumidores y mantener sus mismas características organolépticas (3). Respondiendo a esta demanda, la industria alimentaria está desarrollando e incorporando nuevas tecnologías, tales como la microencapsulación de ingredientes alimentarios, para conseguir alimentos funcionales, más optimizados y saludables, y con similares características sensoriales (1).

Las ciclodextrinas (CDs) nativas (α -CD, β -CD, y γ -CD), al ser sustancias GRAS “generalmente reconocidas como seguras” por la FDA y, al poder formar complejos de inclusión de hospedador-huésped a través de técnicas de microencapsulación, se pueden utilizar en un amplio espectro de aplicaciones dentro de la industria alimentaria (4). Actualmente, la microencapsulación de lípidos en la industria alimentaria se realiza para protegerlo frente a factores ambientales, enmascarar o preservar sabores y aromas, prolongar la vida útil de los alimentos a los que se aplica y/o mejorar la estabilidad de los ingredientes sensibles de la matriz alimentaria utilizada (1,5).

Esta Tesis propone modificar la tecnología del proceso de elaboración de alimentos empanados refrigerados mediante la eliminación de la operación de pre-fritura y la introducción, en la operación de rebozado o de empanado de aceite de oliva virgen extra (AOVE) microencapsulado en CDs, con el fin de 1) satisfacer la demanda actual del consumidor de productos más saludables y que posean las características organolépticas tradicionales, 2) mejorar la seguridad microbiológica, y prolongar la vida útil de estos productos, y 3) reducir significativamente el contenido de grasa total del producto, utilizando la cantidad mínima de aceite microencapsulado necesario para una adecuada aceptación sensorial del producto.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Investigación y revisión bibliográfica

Revisión bibliográfica sobre las nuevas tecnologías de conservación y elaboración de productos empanados refrigerados más saludables, de mayor vida útil y con mejoras en seguridad alimentaria. Se realizará especialmente una revisión bibliográfica sobre las técnicas de microencapsulación de aceites de semillas y de oliva, y su influencia sobre la eficacia de encapsulación y la estabilidad oxidativa de estos aceites. También, se revisará la bibliografía referente a las nuevas tecnologías de horneado con aire caliente, infrarrojos y microondas, que sean de aplicación para la preparación de alimentos empanados.

2.2 Desarrollo, evaluación y comparación de la nueva metodología vs la tradicional

Desarrollar (a escala de laboratorio) y valorar la posibilidad de implementar una nueva tecnología de proceso (a escala industrial) que satisfaga a los consumidores a la vez que sea rentable para la industria alimentaria. Para ello, se encapsulará AOVE (obtenido de un supermercado local), mediante la técnica de encapsulación de mezcla física en base al método descrito por Mourtzinis et al. (6) con algunas modificaciones propuestas por el Grupo de Investigación en Ingeniería del Frio y la Seguridad Alimentaria (7,8). Se evaluará la estabilidad oxidativa (TOTOX, pV, p-AV, K_{270} y K_{320}) y la eficacia de la encapsulación (XRD, DSC). Se evaluará a escala de laboratorio la introducción de diferentes proporciones de AOVE:CD en la operación de empanado o rebozado (pan rallado o ligante: complejo de inclusión); y se realizará un estudio de calidad y vida útil del control frito (metodología convencional) y de la nueva metodología desarrollada (sin pre-fritura con oliva y con microencapsulados de AOVE) evaluando un estudio de color, microbiológico, sensorial y del contenido total de grasa (antes y después del horneado, simulando el cocinado que se realiza antes de consumir). Con el programa informático Rstudio, se realizará un análisis estadístico ANOVA seguido de la prueba Tukey HSD a un nivel de confianza del 95 % y del 99 %.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se espera lograr similares características sensoriales en el producto obtenido con la nueva tecnología, respeto a la fritura convencional, implicando un avance tecnológico por la obtención de las características organolépticas de un producto frito (crujiente exterior, jugoso interior, color dorado, y un aroma y sabor agradables), pero sin realizar una fritura previa con aceite. Se

pretende mejorar la calidad microbiológica, en cuanto a control de microorganismos aerobios mesófilos totales, bacterias ácido lácticas, enterobacterias, mohos, levaduras, *Pseudomonas* y psicrófilos, para extender la vida útil del producto empanado refrigerado. Además, se espera obtener un producto mucho más saludable que el obtenido con tecnología convencional, ya que tendrá un contenido en grasa mucho menor, y estará enriquecido en fibra soluble.

4. CONCLUSIONES

Mediante esta Tesis doctoral se pretende desarrollar una innovación tecnológica en la elaboración de alimentos empanados refrigerados que consiste en la eliminación de la operación de pre-fritura en aceite, y la introducción de AOVE microencapsulado en la etapa de empanado o rebozado. La introducción del aceite microencapsulado en la formulación del producto empanado refrigerado junto con una técnica apropiada de horneado pretende ser una alternativa tecnológica a la fritura tradicional industrial.

5. AGRADECIMIENTOS

Estos trabajos son financiados por la empresa FRIPOZO S.A. a través del Proyecto CDTI Ref.: IDI-20190627, y del contrato correspondiente con la Universidad Politécnica de Cartagena, que financia la beca predoctoral de Marta Barón.

6. REFERENCIAS

1. Sobel R, Versic R, Gaonkar AG Introduction to Microencapsulation and Controlled Delivery in Foods. In: Microencapsulation in the Food Industry. Elsevier. 2014;3-12
2. Tuorila H, Hartmann C. Consumer responses to novel and unfamiliar foods. Vol. 33, Current Opinion in Food Science. Elsevier Ltd; 2020;1-8.
3. Soto-Jover S, Boluda-Aguilar M, Esnoz-Nicuesa A, Iguaz-Gainza A, López-Gómez A. Texture, Oil Adsorption and Safety of the European Style Croquettes Manufactured at Industrial Scale. Food Eng Rev. 2016;8(2):181-200. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12393-015-9130-2>
4. Singh M, Sharma R, Banerjee UC. Biotechnological applications of cyclodextrins. Biotechnol Adv. 2002 Dec 1;20(5-6):341-59.
5. Velasco J, Velasco J, Dobarganes C, Márquez-Ruiz G. Variables affecting lipid oxidation in dried microencapsulated oils. Grasas y Aceites. 2003 [cited 2020 Sep 1];54(3):304-14. <http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/246>
6. Mourtzinou I, Salta F, Yannakopoulou K, Chiou A, Karathanos VT. Encapsulation of olive leaf extract in β -cyclodextrin. J Agric Food Chem. 2007;55(20):8088-94. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
7. Buendía-Moreno L, Sánchez-Martínez MJ, Antolinos V, Ros-Chumillas M, Navarro-Segura L, Soto-Jover S, et al. Active cardboard box with a coating including essential oils entrapped within cyclodextrins and/or halloysite nanotubes. A case study for fresh tomato storage. Food Control. 2020;107:106763.
8. Navarro-Segura L, Ros-Chumillas M, López-Cánovas AE, García-Ayala A, López-Gómez A. Nanoencapsulated essential oils embedded in ice improve the quality and shelf life of fresh whole seabream stored on ice. Heliyon. 2019;5(6):e01804.